

THESE

PRESENTÉE A

L'UNIVERSITE DE NANCY I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Edith DELLACHERIE

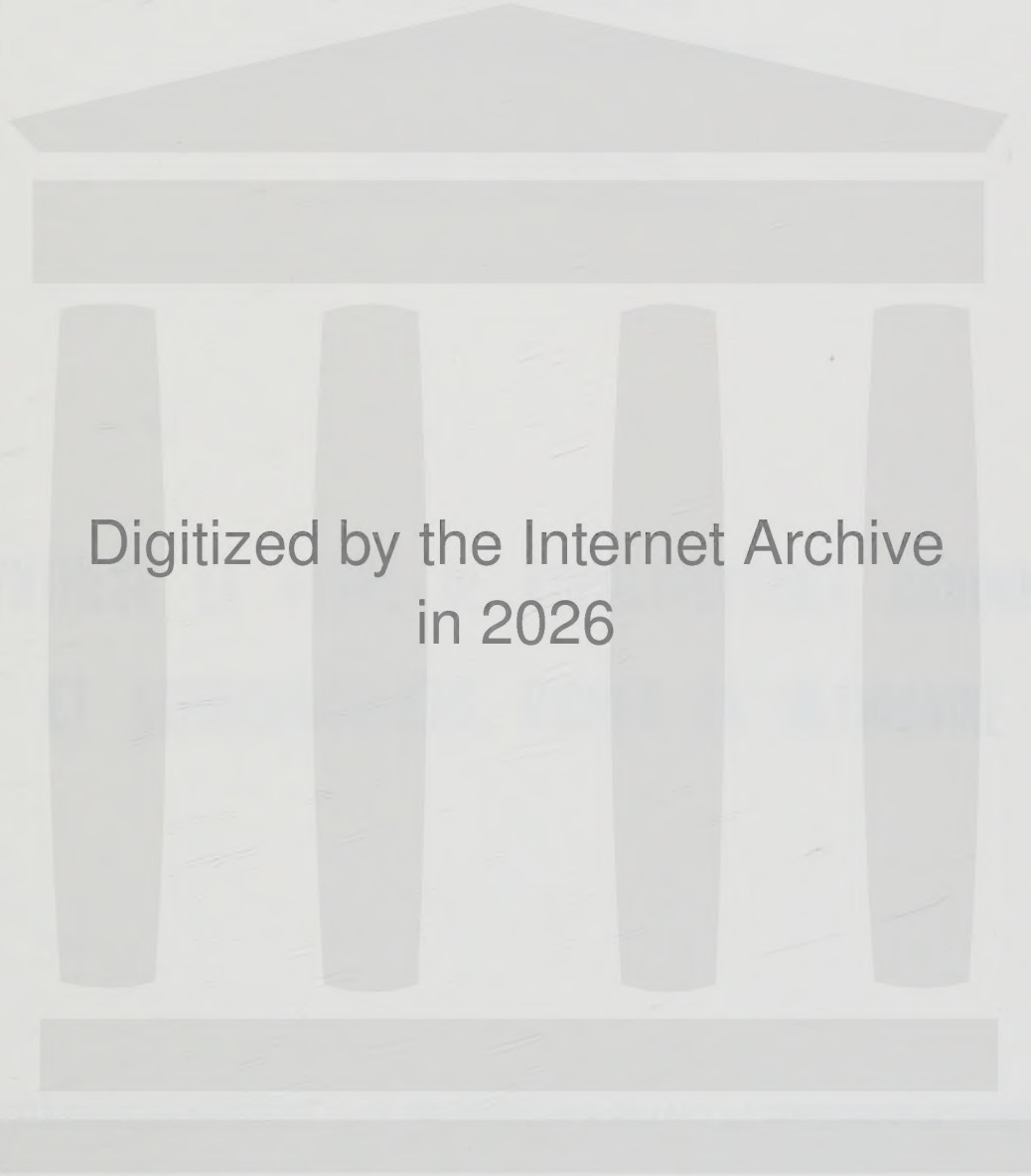
Ingénieur des Industries Chimiques

SYNTHESE ET ETUDE DE COPOLYPEPTIDES ORDONNES
ET STEREOREGULIERS, RICHES EN METHIONINE

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 14 DECEMBRE 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury

Président	:	Mr.	J .	BARRIOL
Examineurs	:	MM.	P .	HORN
			M.	METCHE
			J .	NEEL
			C .	SADRON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551918_0009

THESE

PRESENTÉE A

L'UNIVERSITE DE NANCY I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Edith DELLACHERIE

Ingénieur des Industries Chimiques

**SYNTHESE ET ETUDE DE COPOLYPEPTIDES ORDONNES
ET STEREOREGULIERS, RICHES EN METHIONINE**

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 14 DECEMBRE 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury

Président	:	Mr.	J .	BARRIOL
Examineurs	:	MM.	P .	HORN
			M.	METCHE
			J .	NEEL
			C .	SADRON



Le présent travail a été effectué au Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de NANCY, Equipe de Recherche Associée au Centre National de la Recherche Scientifique n°23.

Que Monsieur le Professeur J.NEEL, qui a bien voulu m'y accueillir, trouve ici l'hommage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Directeur Général du C.N.R.S. pour l'aide matérielle que m'a apportée cet organisme et je suis très reconnaissante à Monsieur P.SIGWALT, Professeur à l'Université VI de Paris, d'avoir accepté de parrainer cette thèse.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Monsieur le Professeur C.SADRON, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans, qui me fait l'honneur d'examiner ce travail.

Que Monsieur le Professeur J.BARRIOL, Directeur du Laboratoire de Chimie Théorique à l'Université I de Nancy, qui a accepté la présidence de mon Jury soit assuré de ma respectueuse gratitude.

Je remercie également Messieurs les Professeurs P.HORN, Directeur du Laboratoire de Biophysique à l'Université I de NANCY, et M.METCHE, Directeur du Laboratoire de Biochimie Appliquée à l'Institut National Polytechnique de Nancy, pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail.

Il m'est très agréable de remercier tous les chercheurs qui ont permis la poursuite de mes travaux; parmi eux, je voudrais citer tout particulièrement les collaborateurs de Monsieur le Professeur P.HORN, M.F.COLONNA-CESARI à qui sont dues les études radiocristallographiques des polymères et M.SERRET qui a déterminé leurs masses moléculaires.

Que tous mes camarades du laboratoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour l'ambiance cordiale qui a toujours régné parmi nous; je tiens en particulier à remercier tous les chercheurs qui, de près ou de loin, ont "goûté" à la chimie des peptides, pour les nombreuses discussions que nous avons eues et pour les contacts très agréables qu'ils ont su établir au sein de ce groupe de recherche.

Enfin, je ne veux pas manquer d'évoquer l'aide compétente de tous les collaborateurs techniques et administratifs de l'E.N.S.I.C.; je leur en sais gré à tous, notamment à Madame Th. GEOFFROY et à Madame F.HOFFNUNG à qui je dois la réalisation matérielle de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> : Problèmes posés par la synthèse d'un copolypeptide ordonné. Préparation et étude d'un polytripeptide.....	6
<u>I-1.</u> Méthodes utilisées pour la préparation des copolypeptides ordonnés.....	7
<u>I-2.</u> Facteurs limitant la masse moléculaire des chaînes polypeptidiques.....	8
<u>I.2.1-</u> Pureté chimique des réactifs et du solvant.....	8
<u>I.2.2-</u> Cyclisation des monomères.....	9
<u>I.2.3-</u> Solubilité du polymère.....	10
<u>I.2.4-</u> Problème de la racémisation.....	10
<u>I-3.</u> Synthèse et étude d'un polytripeptide.....	13
<u>I.3.1-</u> Choix du mode de polycondensation.....	14
<u>I.3.2-</u> Préparation du tripeptide C-activé.....	14
<u>I.3.3-</u> Polycondensation et étude du polycondensat.....	19
<u>I-4.</u> Conclusions.....	25
<u>DEUXIEME PARTIE</u> : Synthèse et étude d'un polydipeptide doué d'une haute régularité stérique.....	28
<u>II.1-</u> Choix de la séquence dipeptidique.....	28
<u>II.2-</u> Synthèse et contrôle de la pureté optique du dipeptide C-activé.....	29
<u>II.2.1-</u> Préparation du dipeptide.....	29

.../...

II.2.2-Contrôle de la pureté optique des monomères. ----- Comparaison des méthodes A et B	32
<u>II.3</u> - Conditions de polycondensation et séparation des fractions.....	36
<u>II.4</u> - Etude de la fraction soluble dans le chloro- forme.....	37
<u>II.4.1</u> -Détermination des masses moléculaires.....	37
<u>II.4.2</u> -Viscosités.....	38
<u>II.4.3</u> -Conformation.....	38
<u>II.5</u> - Conclusions.....	46
<u>TROISIEME PARTIE</u> : Synthèse et étude d'un polytripep- tide doué d'une haute régularité stérique; extension du procédé à la synthèse d'un poly- tétrapeptide.....	48
<u>III.1</u> - Synthèse et étude du polytripeptide.....	48
<u>III.1.1</u> -Préparation du tripeptide activé.....	48
<u>III.1.2</u> -Conditions de polycondensation.Séparation des fractions.....	52
<u>III.1.3</u> -Etude physicochimique du polycondensat....	53
<u>III.2</u> - Préparation et caractérisation du polytétra- peptide (Met ₃ -Ala) _n	63
<u>III.2.1</u> -Synthèse du tétrapeptide.....	63
<u>III.2.2</u> -Polycondensation et caractérisation du po- -----lycondensat.....	64
<u>III.2.3</u> - Conclusions.....	66
<u>III.3</u> - Comparaison des copolypeptides ordonnés riches en méthionine avec la poly-L-Méthionine.....	67

.../...

<u>QUATRIEME PARTIE</u> : Importance comparée de la pureté chimique et de la pureté stérique des amino-esters activés utilisés dans la synthèse des copolypeptides ordonnés.....	69
<u>IV.1</u> - Rôle de la pureté optique du monomère.....	70
<u>IV.1.1</u> - Préparation du "monomère" et polycondensation.....	70
<u>IV.1.2</u> - Etude physicochimique de la fraction soluble.....	71
<u>IV.1.3</u> - Conclusions relatives à l'influence de la pureté optique du monomère sur les propriétés du polycondensat.....	76
<u>IV.2</u> - Rôle de la pureté chimique du monomère.....	78
<u>IV.2.1</u> - Préparation du monomère.....	79
<u>IV.2.2</u> - Polycondensation.....	79
<u>IV.2.3</u> - Propriétés physicochimiques du polycondensat.....	80
<u>IV.3</u> - Conclusions relatives à l'importance respective de la pureté chimique et de la pureté stéréochimique des amino-esters activés.....	82
<u>IV.4</u> - Importance de la racémisation pendant la polycondensation.....	85
 -CONCLUSION.....	 88
 -Partie Expérimentale.....	 93
 -BIBLIOGRAPHIE.....	 113
 - <u>Annexe I</u> : Signification des symboles utilisés.....	 118
<u>Annexe II</u> : Clichés de diffraction des rayons X.....	119

SYNTHESE ET ETUDE DE COPOLYPEPTIDES ORDONNES
ET STEREOREGULIERS RICHES EN METHIONINE

I N T R O D U C T I O N

Les protéines sont des composés macromoléculaires d'origine naturelle dont le poids moléculaire est très variable suivant les espèces; il peut être compris entre 10.000 et plusieurs millions. Une autre caractéristique remarquable se trouve dans le fait que ces produits ne présentent aucune polydispersité en masse moléculaire.

Les macromolécules protéiniques sont constituées par des enchaînements polypeptidiques qui assemblent des unités dont le poids moléculaire est voisin de 100. L'étude de leur hydrolysats montre que les résidus en question dérivent d'une vingtaine d' α -amino-acides différents dont la nature ne varie pas quand on passe des organismes les plus simples (monocellulaires, bactéries) aux êtres les mieux organisés.

Il apparaît donc que c'est "de la structure, de la forme d'une protéine donnée que dépend la discrimination stéréospécifique particulière qui constitue sa fonction". Ces quelques mots tirés de l'ouvrage de J.MONOD* définissent assez bien ce que sont les protéines et le rôle qu'elles jouent dans la vie. Par ailleurs, c'est une idée courante maintenant que de penser qu'il y a un rapport étroit entre la conformation d'une telle macromolécule et sa fonction particulière; en effet, on estime que pour une enzyme donnée, par exemple, sa spécificité réactionnelle vis-à-vis de tel ou tel substrat dépend essentiellement de la conformation qu'elle adopte.

* J.MONOD: "Le Hasard et la Nécessité" Editions du Seuil.

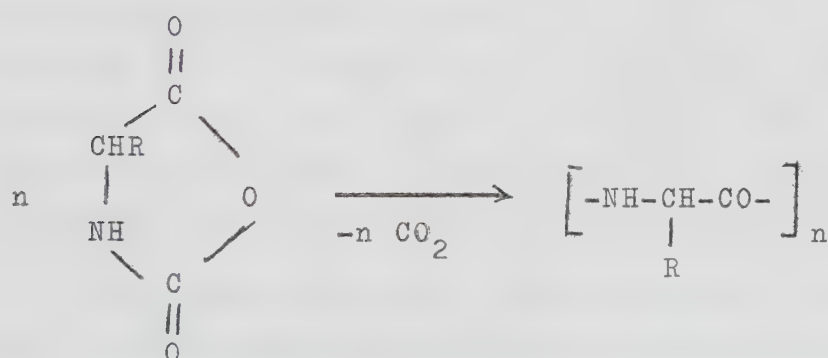
Pour mettre en évidence l'existence et la nature des relations qui existent entre la structure et l'activité biologique des protéines, on peut procéder de plusieurs façons.

Une première voie consiste à étudier les protéines naturelles, leur composition et les conformations qu'elles adoptent dans différents milieux.

Une deuxième méthode, qui semble intéressante pour le chimiste, est de reproduire par synthèse, des séquences oligopeptidiques présentant une certaine activité biologique et de substituer tour à tour les différents résidus, afin de déterminer le rôle spécifique joué par chacun d'eux.

Enfin, on peut également entreprendre de préparer des substances polypeptidiques plus simples que les protéines elles-mêmes, afin de les utiliser comme substances modèles dans une étude systématique, dont le but est de rechercher la relation qui peut exister entre les structures primaires et secondaires de ces macromolécules.

Un tel résultat peut être obtenu, par exemple, en formant divers homopolypeptides à partir des oxazolidine-diones-2,5 (anhydrides de LEUCHS) correspondantes.



Cette réaction permet en effet de préparer des produits de poids moléculaire élevé et doués d'une assez bonne régularité stérique parce qu'il semble que le processus mis en cause ne provoque pas d'inversion notable du centre asymétrique du monomère. En outre, des enchaînements contenant des résidus de

nature différente et statistiquement distribués peuvent être obtenus en opérant avec un mélange d'anhydrides de LEUCHS. Toutefois, l'intérêt de ce type de composés se trouve limité par le caractère aléatoire de la distribution des différentes unités peptidiques constitutives, lequel empêche d'établir une relation très rigoureuse entre structure et propriétés.

Pour progresser dans ce domaine, il nous a paru nécessaire de disposer de procédés de synthèse suffisamment élaborés pour être en mesure de préparer, à volonté, des espèces polypeptidiques très stéréorégulières et constituées par la répétition d'un motif oligopeptidique déterminé; ceci afin de pouvoir ultérieurement mettre en évidence les propriétés originales qui se trouvent liées à la séquence particulière choisie.

Tel est le problème auquel nous avons tenté d'apporter quelques éléments de solution et que nous avons abordé en cherchant à trouver la meilleure façon de synthétiser une structure polypeptidique périodique et stéréorégulière de formule générale $(X_pY)_n$, X et Y étant deux résidus peptidiques de nature différente.

Dans notre projet l'unité majoritaire X est plus particulièrement destinée à conférer au produit ainsi élaboré des propriétés qui le rendent facile à manipuler et à étudier. C'est pourquoi nous avons porté une attention plus particulière aux polypeptides riches en méthionine ($R = -CH_2-CH_2-S-CH_3$) dont certaines caractéristiques sont, à notre avis, très favorables.

En premier lieu, une étude préalable effectuée sur la poly L-méthionine a montré que ce polypeptide particulier, qui est soluble dans des solvants relativement peu actifs comme le chloroforme, adopte une conformation α -hélicoïdale remarquablement stable puisqu'il conserve en effet une hélicité voisine de 65% dans des milieux réputés peu hélicogènes comme l'acide dichloracétique. Une deuxième circonstance favorable se trouve dans le fait que le substituant latéral absorbe peu dans

l'infra-rouge. Il s'ensuit que l'on peut aisément recourir à cette spectroscopie pour observer le comportement des liens peptidiques en opérant avec des solutions du polymère dans le chloroforme. Enfin, il est connu que les atomes de soufre des fonctions thioéther ne sont pas totalement inertes. Il est possible d'envisager leur transformation chimique en sites sulfoxyde, sulfone, sulfonium et on peut donc espérer pouvoir modifier ultérieurement la solubilité de ces composés.

Au contraire, le segment minoritaire Y doit être considéré comme le résidu singulier dont on cherche précisément à reconnaître les caractéristiques particulières lorsqu'il se trouve inclus dans une structure polypeptidique.

Le présent travail est entièrement consacré à l'unité alanyl que nous avons introduite en proportion variable dans des enchaînements de polyméthionine en réalisant des copolypeptides ordonnés de formule générale $(-\text{Met}_p-\text{Ala}-)_n$ où p a été pris égal à 1, 2 et 3.

La synthèse de ces composés nous a posé un certain nombre de problèmes.

D'une façon générale, l'opération est effectuée en polycondensant un oligopeptide intermédiaire dont on a préalablement activé l'extrémité C-terminale. Dans notre cas, le choix de cet oligopeptide n'est pas indifférent à cause des difficultés supplémentaires que l'on rencontre lorsque l'on opère avec des espèces où le résidu méthionyle se trouve en position C-terminale.

Dans la mesure où l'on attache une certaine importance à la stéréorégularité du polypeptide obtenu il y a lieu de se préoccuper de la pureté optique de tous les intermédiaires, ce qui est d'autant plus difficile que ces réactifs contiennent un plus grand nombre de centres asymétriques.

.../...

Il ne faut pas en conclure pour autant que la solution consiste à polycondenser un dipeptide activé. En effet, on se trouve alors dans des conditions telles qu'il se forme des quantités importantes de dicétopipérazine et l'onⁿa par ailleurs, aucune assurance concernant la stéréospécificité de la réaction de polycondensation.

Ces quelques remarques expliqueront l'ordre, qui peut surprendre, dans lequel nous exposerons les résultats que nous avons obtenus à partir d'oligopeptides activés à l'état d'esters p-nitrophényliques.

Nous consacrerons la première section de notre rapport aux essais préliminaires que nous avons effectués avec des réactifs tripeptidiques. C'est en effet par cette voie que nous avons réussi, pour la première fois, à obtenir, avec des rendements convenables, des polypeptides ordonnés, de poids moléculaire moyennement élevé, dont une partie demeurerait soluble dans des mélanges de solvants riches en chloroforme.

Ensuite nous avons repris d'une façon plus systématique l'étude de l'influence de la pureté optique du monomère intermédiaire ce qui nous a conduit à comparer différents procédés de synthèse des dipeptides activés afin de sélectionner les voies qui permettent d'éviter la racémisation.

La mise au point de ces méthodes nous a permis de réaliser l'expérience décrite dans la troisième partie et qui concerne la polycondensation d'un tripeptide de stéréochimie connue. L'essai a d'ailleurs pu être reproduit avec un tétrapeptide.

Enfin on trouvera dans la dernière section quelques considérations sur les facteurs qui nous paraissent déterminer les propriétés physico-chimiques des polypeptides obtenus par les procédés que nous avons sélectionnés. Nous y insisterons en particulier sur l'importance relative de la pureté chimique et de la pureté optique des oligopeptides utilisés comme intermédiaires de synthèse.

La description détaillée des expériences effectuées a été rejetée à la fin du texte.

PREMIERE PARTIE

PROBLEMES POSES PAR LA SYNTHÈSE D'UN COPOLYPEPTIDE ORDONNÉ.

PREPARATION ET ÉTUDE D'UN POLYTRIPÉPTIDE.

La formation d'une liaison peptidique procède par l'attaque nucléophile de la fonction amine d'un acide aminé sur la fonction carboxylique d'un autre amino-acide, les groupes fonctionnels non concernés par la condensation devant être préalablement protégés:



Cette attaque est favorisée, soit en activant la fonction amine, c'est-à-dire en augmentant le caractère nucléophile de l'azote, soit en activant la fonction carboxylique par un substituant fortement électro-attracteur. On peut également faciliter la condensation en introduisant sur la fonction carboxylique, des substituants capables de favoriser l'approche du nucléophile vers le $\text{C} = \text{O}$, par l'établissement de liaisons hydrogène; ce mécanisme est désigné habituellement sous le nom d'accélération anchimérique.

I. 1- METHODES UTILISEES POUR LA PREPARATION DES COPOLYPEPTIDES ORDONNES .

Le premier copolypeptide ordonné fut accidentellement obtenu en 1952 ⁽¹⁾ comme sous produit d'une réaction de cyclisation de l'anhydride mixte d'un tripeptide riche en glycine. Ultérieurement quelques essais furent effectués, en particulier, à la suite de recherches faites sur la structure du collagène, en vue de synthétiser des copolypeptides ordonnés à base de proline ou d'hydroxyproline ⁽²⁾. En fait, ce n'est vraiment qu'à partir de 1963, date à laquelle DETAR et coll. ⁽³⁾ publièrent un article décrivant la polycondensation d'esters activés de quelques tripeptides que les travaux dans le domaine des copolypeptides ordonnés se multiplièrent.

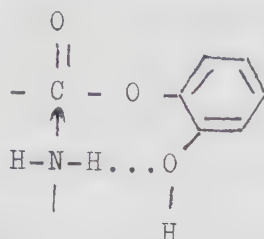
Pratiquement, on peut dire que toutes les méthodes qui sont connues comme capables de conduire à la formation du lien peptidique ont été éprouvées dans le domaine de la polycondensation. Des essais ont été effectués en ayant successivement recours à la méthode azide (4c,7), à la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide (2,4), aux anhydrides mixtes (4d), au tétraéthylpyrophosphite (4c,5,6) et au bis.o.phénylène pyrophosphite (4c,6).

Pourtant c'est le procédé qui utilise les esters activés qui est le plus couramment employé et qui permet généralement d'obtenir les meilleurs résultats. De très nombreux esters activés d'oligopeptides ont été préparés et polycondensés: ester de la N.hydroxysuccinimide(5,6), ester β .pyridilique (8a), hydroxy 8-quinoléique (8d), esters de phénols substitués (cf. tableau I)

Méthodes de polycondensation	Références
ester p.nitrophénylique	3,4c,9
ester dinitro 2,4 phénylique	4c
ester dinitro 2,5 phénylique	4c
ester trichloro 2,4,5 phénylique	9b
ester trichloro 2,4,6 phénylique	8e
ester pentachlorophénylique	4d,4e,10,11
ester pentafluorophénylique	8c
ester o.hydroxyphénylique	12

Tableau I: esters activés dérivés du phénol,
utilisés pour la synthèse de copolypeptides ordonnés.

On constatera que l'activation est généralement due à un simple effet inductif. Exceptionnellement, comme dans le cas des esters o.hydroxyphényliques (¹²), elle fait intervenir une liaison hydrogène (accélération anchimérique)



Nous citerons également, pour mémoire, le travail effectué par SAKAKIBARA et coll. (¹³) qui ont préparé deux polytripeptides, en condensant respectivement dix et vingt fois de suite la séquence tripeptidique à une glycine fixée sur un support solide.

I.2 - FACTEURS LIMITANT LA MASSE MOLECULAIRE DES CHAINES POLYPEPTIDIQUES.

Après avoir examiné toutes les publications antérieures qui traitent de la préparation de copolypeptides ordonnés, il est difficile de se faire une opinion précise sur la meilleure façon d'effectuer de telles synthèses. En effet, si l'on porte son attention sur la masse moléculaire des produits décrits, il apparaît que la diversité des moyens employés pour mesurer cette grandeur est telle qu'il n'est pas possible de comparer entre elles les valeurs rapportées par les différents expérimentateurs. C'est pourquoi, nous nous bornerons à extraire de ces travaux les quelques conditions qu'il nous semble important de satisfaire pour obtenir des espèces macromoléculaires suffisamment polycondensées.

I.2.1. - Pureté chimique des réactifs et du solvant.

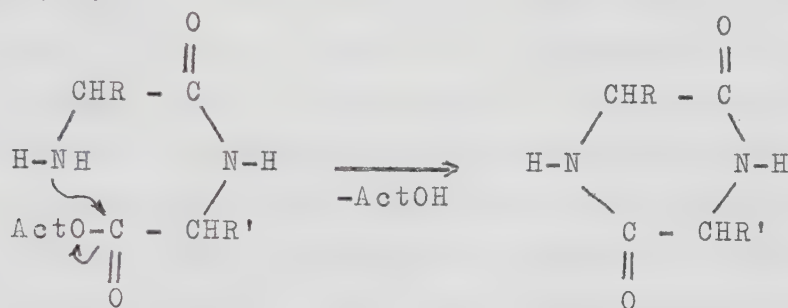
La présence d'impuretés dans les différents réactifs et dans le solvant est un obstacle à la croissance régulière

.../...

des chaînes polypeptidiques en favorisant des réactions de terminaison. En particulier, dans le cas de la polycondensation d'espèces activées, il est évident que toute impureté nucléophile présente dans le milieu, peut venir désactiver l'extrémité carboxylique de l'oligopeptide. C'est pourquoi, indépendamment de l'attention que l'on apportera à la rectification des solvants, il y aura intérêt à utiliser des réactifs intermédiaires cristallisables aisément purifiables.

1.2.2.- Cyclisation des monomères.

Lorsque l'on tente de polycondenser un oligopeptide C-activé, l'une des réactions que l'on peut craindre est la cyclisation du peptide sur lui-même par "auto-aminolyse". En particulier, la formation de dicétopipérazine a souvent été mise en évidence lors de la polycondensation de dipeptides C-activés (9c).



dipeptide C-activé

Act = groupe activateur électroattracteur
(p.nitrophényle par exemple).

Cette cyclisation est moins probable pour des chaînes peptidiques plus longues, et pour éviter cette réaction parasite, on conseille généralement d'opérer en solution très concentrée ou d'effectuer la polycondensation en présence d'une petite quantité de monomère préformé dont l'extrémité carboxylique a été bloquée par un ester inactif (¹¹).

Certains auteurs ont également mentionné la formation d'une proportion non négligeable de dimère cyclique lors de la

.../...

polycondensation, en solution concentrée, d'oligopeptides contenant un nombre pair de résidus, tels que des tétrapeptides ou des hexapeptides; cette cyclisation dépendrait de la tendance des molécules à s'associer, en solution, pour former des paires antiparallèles (^{4b}). Le même phénomène aurait été également observé avec des solutions concentrées de tripeptides C-activés dans des solvants associants (^{4e}).

I.2.3.- Solubilité du polymère

Si l'on veut obtenir une chaîne polypeptidique suffisamment longue, il apparaît important que la polycondensation ne soit pas interrompue par la précipitation prématurée du polymère qui se forme, pour que les réactions de couplage puissent se poursuivre. Cette condition est assez difficile à remplir puisque l'on est, par ailleurs, obligé d'opérer dans des milieux concentrés pour éviter la cyclisation. Il ne faut toutefois pas surestimer l'importance de la solubilité. En effet il semble que la réaction de polycondensation peut se poursuivre dans une phase solide pourvu que celle-ci soit suffisamment gonflée et que les réactifs puissent y pénétrer; les condensations pourraient avoir lieu entre un polymère en formation sous forme précipitée, et des molécules C-activées en solution selon le principe justement appliqué par MERRIFIELD (¹⁴) pour la synthèse d'oligopeptides en phase solide.

I.2.4.- Problème de la racémisation.

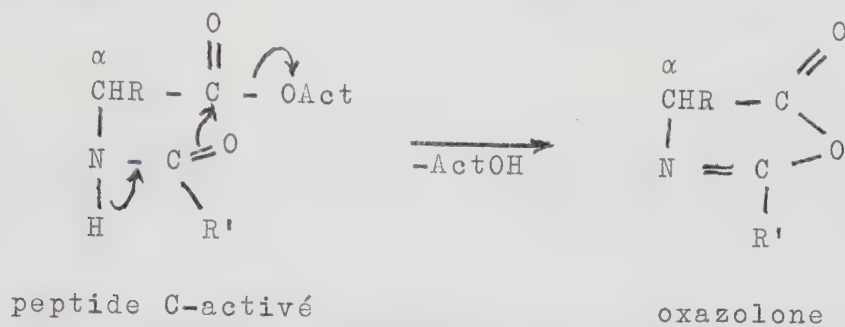
La conservation du signe des centres asymétriques est une préoccupation permanente dans la chimie des peptides. En particulier, au cours de la synthèse d'un copolypeptide ordonné, la racémisation peut intervenir soit lors de la préparation de l'oligomère et de son activation, soit pendant la polycondensation, c'est-à-dire pendant l'aminolyse de l'espèce activée.

Par ailleurs, une petite quantité de diastéréoisomère indésirable dans le produit de départ peut perturber la formation

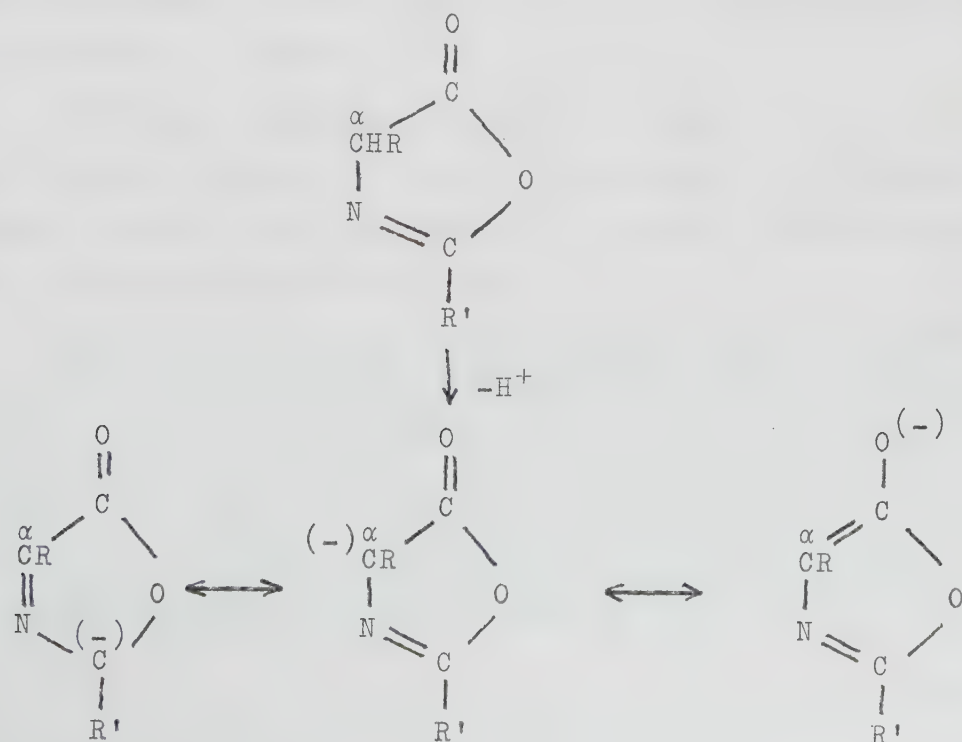
régulière des chaînes polypeptidiques et c'est pourquoi il paraît important d'opérer avec des monomères optiquement purs.

Les processus qui provoquent l'inversion de configuration du centre asymétrique contenu dans un résidu peptidique résultent principalement de la formation intermédiaire d'une oxazolone, ou de l'arrachement, sous forme d'un proton, de l'hydrogène qui est porté par le C^α .

Dans le premier cas, l'oxazolone se forme dès que le milieu devient légèrement basique, à la suite d'une attaque nucléophile du site carbonyle sur le carbone activé qui le suit dans l'enchaînement:

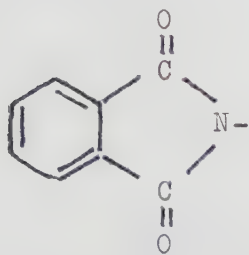


L'apparition de cette structure cyclique est très défavorable parce que la liaison C^α -H y devient facilement hétérolysable du fait de la stabilisation, par résonance, du carbanion correspondant.

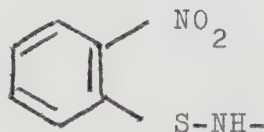


Un milieu même faiblement basique suffit à provoquer cette évolution qui entraîne l'inversion progressive du centre asymétrique.

Une première façon d'éviter la racémisation au cours de la synthèse des peptides consiste à utiliser des groupes protecteurs qui ne permettent pas la formation d'oxazolone. Tel est le cas par exemple, des substituants phtaloyle et o.nitrophénylsulfényle.



Fonction amino-terminale protégée par le groupe phtaloyle.



Fonction amino-terminale protégée par action du chlorure d'O.nitrophénylsulfényle.

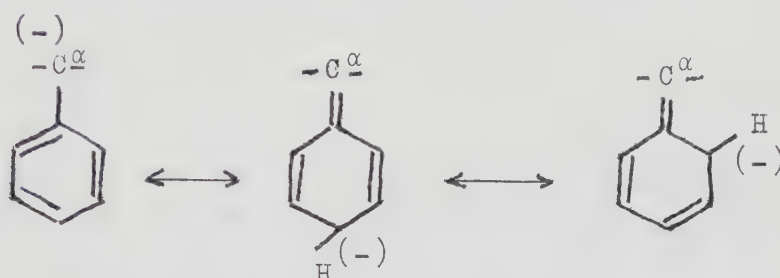
Par ailleurs, l'expérience montre qu'il n'y a pas cyclisation lorsque la fonction amine terminale est préalablement transformée en groupe uréthane par action d'un chlorure d'alcoxy- ou d'aryloxy-carbonyle. D'après H.DETERMANN (¹⁶) qui a étudié ces composés par infra-rouge et en résonance magnétique, l'oxygène du groupe C = O y serait bien moins nucléophile que dans un carbonyle d'amide.

En ce qui concerne l'extrémité acide ou ester, il va de soi que son aptitude à former l'oxazolone est d'autant plus grande qu'elle est plus activée et il est par conséquent difficile d'intervenir sur ce point.

Beaucoup d'auteurs se sont penchés sur ce problème, et si, pour la synthèse des oligomères on peut dans certains cas minimiser ou même supprimer la perte d'activité optique, par contre, les conclusions quant à l'efficacité de certains esters activés ne sont pas encore très sûres, du moins pour ce qui concerne la conservation du signe optique.

.../...

Certains auteurs ont constaté que la protection par le groupe phtaloyle ou le groupe O.nitrophénylsulfényle n'empêche pas dans tous les cas, la racémisation. Il apparaît donc que l'hétérolyse de la liaison $C^{\alpha}-H$ peut avoir lieu sur un résidu qui ne peut pas être cyclisé sous forme d'oxazolone. Il semble que cette évolution directe puisse se produire lorsque le substituant latéral de l'unité peptidique est capable de stabiliser le centre carbanionique, en permettant une délocalisation de sa charge négative. Tel est le cas, par exemple de la phénylglycine (¹⁷).



Un mécanisme de β -élimination-réaddition (¹⁸) pour les dérivés benzyloxycarbonylés de la S-benzyl cystéine et de la O. benzyl sérine a également été invoqué, mais il semble qu'il soit maintenant abandonné, tout au moins pour les dérivés de la cystéine (¹⁹).

I.3 - SYNTHÈSE ET ÉTUDE D'UN POLYTRIPEPTIDE

En nous fondant sur ce qui vient d'être exposé, nous avons entrepris la synthèse d'un polytripeptide. Il nous paraissait en effet plus judicieux de commencer nos essais de polycondensation sur un tripeptide pour éviter la réaction de cyclisation en dicétopipérazine que d'autres auteurs avaient mentionnée comme particulièrement gênante dans le cas des intermédiaires dipeptidiques.

Dans le choix des amino-acides constitutifs, nous avons été guidé par le désir d'obtenir une espèce soluble dans un

.../...

solvant transparent dans l'infra-rouge comme le chloroforme. En outre, nous avons cherché à éviter la présence, sur les substituants latéraux, d'oscillateurs capables d'absorber dans la région du spectre où l'on observe les bandes caractéristiques des liens peptidiques.

La poly L-méthionine remplissant ces deux conditions ⁽²⁰⁾ nous avons choisi de préparer des copolypeptides ordonnés, riches en méthionine en associant ce résidu à l'alanine qui est le plus simple des α -amino acides asymétriques.

Dès nos premiers essais, nous avons constaté que les réactifs dans lesquels la méthionine est en position C- terminale avaient un comportement particulier. Il était en général difficile de les purifier à cause de leur bas point de fusion et de leur grande solubilité dans les solvants usuels. Nous avons donc ultérieurement poursuivi nos expériences avec des dérivés du tripeptide méthionyl-méthionyl-alanine.

I.3.1.-Choix du mode de polycondensation.

Les méthodes de polycondensation décrites par D.F. DETAR et coll.⁽³⁾ utilisent les esters p,nitrophényliques et pentachlorophényliques des oligopeptides. En ce qui nous concerne, nous avons renoncé au second type de réactif, parce que l'ester pentachlorophénylique de la méthionyl-méthionyl-alanine est très peu soluble dans les solvants courants.

Ces réflexions successives nous ont donc conduit à orienter nos recherches vers la polycondensation du monomère tripeptidique $\text{HCl}, \text{H-Met-Met-Ala-ONp}^*$ dans lequel les trois résidus sont, au départ, en configuration L.

I.3.2.-Préparation du tripeptide C-activé

Avant de condenser deux acides aminés, il est nécessaire de protéger la fonction amine et la fonction carboxylique qui ne participent pas à la condensation. Quand le dipeptide est formé, on libère alors ces deux fonctions et on isole le peptide sous forme libre.

.../...

* Voir Annexe I ,pour les abréviations utilisées dans toute la suite de ce travail.

Pour obtenir le tripeptide sous sa forme activée, nous avons tout d'abord eu recours à un procédé assez classique (méthode A); celui-ci consiste à provoquer, par la dicyclohexylcarbodiimide par exemple, une série de condensations au cours desquelles un nouvel amino-acide N-protégé qui n'est pas susceptible de former une oxazolone, réagit sur l'ester méthylique d'un peptide.

On obtient ainsi un ester oligopeptidique qui doit être, en principe, optiquement pur, et qu'il s'agit ensuite d'activer, en reestérifiant par le p.nitrophénol la fonction carboxylique préalablement libérée par saponification (figure 1).

Groupes protecteurs .

Pour protéger la fonction amine, nous avons eu recours, dans cette synthèse, au groupe benzyloxycarbonyle ⁽²¹⁾(Z-) qui présente l'avantage de fournir des dérivés aisément cristallisables. En fin de réaction, la fonction amine peut être libérée par l'action d'une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique, ou par hydrogénation catalytique. Cependant, lorsque le peptide préparé porte des substituants latéraux qui contiennent des atomes de soufre, des difficultés apparaissent. Le traitement par l'acide bromhydrique provoque la transformation partielle des résidus méthionyle en segments S-benzyl homocystéine ⁽²²⁾ (figure 2) et l'hydrogénation se trouve perturbée par le fait que les composés soufrés empoisonnent les catalyseurs. Certains auteurs, en ajoutant soit de la cyclohexylamine ^(23a), soit un complexe $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ ^(23b), sont parvenus à éviter cet inconvénient et ont obtenu de bons résultats pour des peptides où la méthionine n'est pas en position N-terminale.

En ce qui nous concerne, nous avons préféré utiliser pour la décarbobenzyloxylation, le procédé préconisé par F.WEYGAND et W.STEGLICH ⁽²⁴⁾, qui consiste à traiter le dérivé N-protégé par l'acide trifluoroacétique chaud, ceci après avoir vérifié que ce traitement n'entraîne aucune dégradation de la chaîne latérale soufrée. Le peptide ainsi libéré est obtenu sous forme

Met	Met	Ala
Z — OH	Z — OH	OMe
		HCl, H
	Z	OMe
		DCCI TEA
Z — OH	HCl, H	OMe
		ATFA, HCl gaz
Z	DCCI	OMe
		TEA
Z	NaOH	OH
Z	HONp	ONp
		DCCI
HCl, H	ATFA	ONp
		HCl gaz

Fig.1 - Synthèse du chlorhydrate de tripeptide activé
par la méthode A.

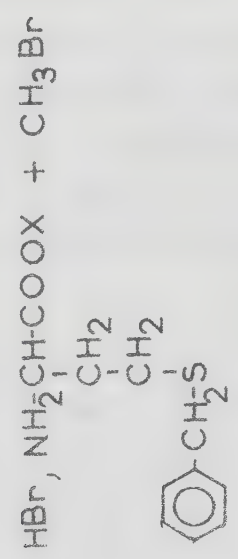
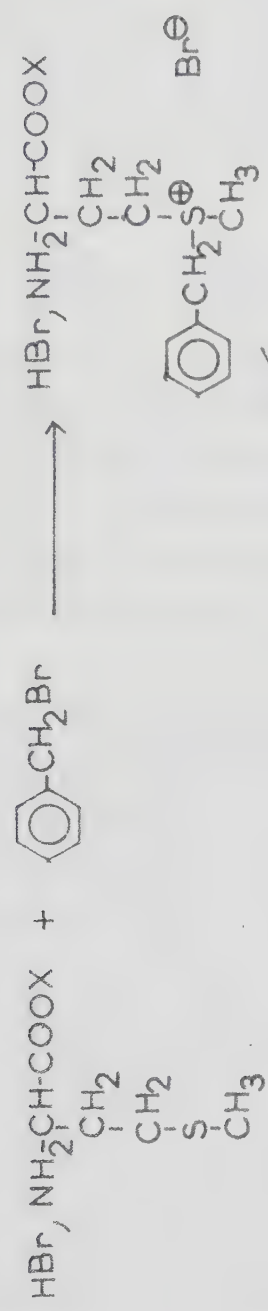
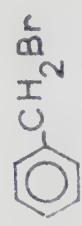


Fig. 2 - Dégradation de la chaîne latérale de la méthionine pendant la décarboboxylation par l'acide bromhydrique.

d'un trifluoroacétate soluble dans l'éthanol et le chloroforme et il peut être reprécipité à l'état de chlorhydrate par addition d'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique.

Par ailleurs, nous avons également préparé des dérivés N-protégés par le groupe tert-butyloxycarbonyl (BOC-) éliminable dans des conditions relativement douces; mais, les difficultés d'introduction de ce groupe protecteur et le bas point de fusion des dérivés correspondants nous ont finalement conduit à l'abandonner.

Evaluation de la pureté optique.

Comme nous l'avons déjà fait remarquer il n'y a que peu de risques de racémisation au cours des étapes de la synthèse qui conduisent à l'ester méthylique du tripeptide N-protégé (fig.1); en effet, toutes les condensations sont effectuées de telle façon que l'oxazolone ne puisse pas se former et le milieu n'est pas assez basique pour qu'il y ait hétérolyse spontanée de la liaison C^α-H.

Au contraire, la saponification de l'ester méthylique et la réactivation de la fonction carboxylique libérée par action du p.nitrophénol en présence de dicyclohexylcarbodiimide réunissent toutes les conditions pour qu'il se produise une inversion au moins partielle du signe optique du résidu alanyl terminal. C'est pourquoi, il nous a paru utile de contrôler systématiquement la pureté optique du tripeptide activé.

A cette fin nous avons d'abord comparé le pouvoir rotatoire de son hydrolysate acide à celui d'une solution témoin contenant des quantités équivalentes des amino-acides L constitutifs et que l'on a soumise aux conditions de l'hydrolyse (acide chlorhydrique concentré, 24 h. à 110°C). Ces essais ne nous ont pas permis de déceler de différence appréciable mais cette constatation, que certains auteurs considèrent parfois comme une preuve de la stéréospécificité de leurs procédés de synthèse, nous paraît très insuffisante pour être affirmatif. Il faut tenir compte en effet d'une part de l'incertitude des mesures et

.../...

d'autre part du fait que l'expérience est généralement effectuée sur un échantillon préalablement purifié par plusieurs recristallisations successives, lesquelles ont pu éliminer les diastéréoisomères minoritaires. Enfin certains auteurs ⁽²⁵⁾ rapportent que les amino-acides peuvent racémiser en milieu fortement acide et que le processus peut être plus rapide lorsque le centre actif est engagé dans un peptide.

Dans les publications relatives aux peptides, nous avons souvent lu que l'on pouvait recristalliser les esters actifs dans le méthanol ou l'éthanol. En ce qui nous concerne, les observations que nous avons faites par spectroscopie ultraviolette (disparition de la bande ester p.nitrophénylique à 269 mμ, apparition d'une absorption caractéristique du p.nitrophénol à 312 mμ) nous ont au contraire montré que les esters p.nitrophényliques des peptides sur lesquels nous opérons, se transestérifiaient rapidement lorsqu'ils étaient dissous dans ces alcools. Cette remarque attirera l'attention sur le fait qu'il est indispensable que toutes les opérations de longue durée auxquelles on soumet de tels esters actifs soient effectuées dans des solvants soigneusement rectifiés et exempts d'impuretés nucléophiles afin d'éviter la désactivation qui résulterait d'une réaction secondaire de substitution.

A la fin de nos synthèses, nous avons donc recristallisé ces peptides C-activés soit dans le chloroforme soigneusement débarrassé d'alcool, soit dans un alcool ramifié, comme l'isopropanol qui, d'après nos essais, ne provoque pas de transestérification notable.

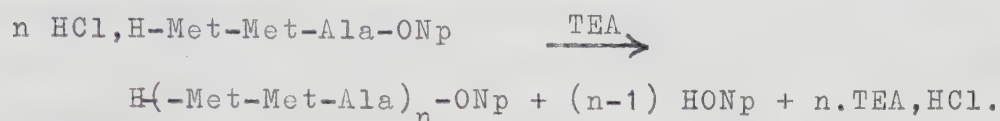
I.3.3.-Polycondensation et étude du polycondensat.

Conditions de polycondensation-

Le chlorhydrate de l'ester p.nitrophénylique du tripeptide préparé par la méthode représentée sur la figure 1, est soumis à plusieurs purifications par dissolution dans l'isopropanol et reprécipitation par l'éther anhydre^{et} semble pur

lorsqu'il est examiné par chromatographie. Toutefois il s'agit d'un produit très hygroscopique et l'analyse révèle un léger excès de chlore qui est vraisemblablement dû à une chimisorption d'acide chlorhydrique.

En tenant compte de cet excès d'acide, nous l'avons polycondensé en présence d'une quantité de triéthylamine suffisante pour assurer la neutralisation du produit et le déplacement de l'hydracide présent sous forme de chlorhydrate.



Cette réaction est effectuée en solution concentrée dans le chloroforme afin de réduire les risques de cyclisation. Au bout de trois jours le rendement de l'opération est voisin de 60%. On obtient alors, après précipitation par l'éther, un produit jaunâtre qui est isolé et lavé successivement à l'alcool et à l'eau. Les résultats de l'analyse élémentaire, se trouvent assez sensiblement perturbés d'une part à cause de la présence des fonctions terminales et en second lieu parce que le polymère adsorbe les solvants au contact desquels il se trouve. Lorsqu'il est lavé à l'eau et séché, dans les conditions usuelles, sa composition se rapproche de celle qui correspondrait à la formule théorique $-(\text{Met-Met-Ala-}, 0,5 \text{ H}_2\text{O})_n$. Enfin son point de fusion est supérieur à 320°C.

Etude du polycondensat.

Le chloroforme, le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde ne permettent d'en extraire qu'une très petite partie. Une fraction plus importante passe en solution dans l'acide formique et la totalité du produit se dissout dans l'acide dichloracétique.

Comme nous l'avons dit plus haut, la détermination des poids moléculaires des copolypeptides ordonnés est un problème important. Les méthodes utilisées sont très variables, mais

.../...

certaines d'entre elles donnent des résultats fort imprécis⁽²⁶⁾. Par exemple, la détermination des poids moléculaires par dosage des fonctions terminales après dinitrophénylation conduit à des résultats qui sont systématiquement surévalués. La faible solubilité du polymère dans les solvants habituels ne nous a pas permis d'utiliser commodément les procédés thermodynamiques classiques, comme l'osmométrie à tension de vapeur. Nous avons préféré opérer en étudiant l'équilibre de sédimentation atteint par centrifugation d'une solution dans l'acide formique. Le volume spécifique calculé d'après les données de E.J.COHN et J.T.EDSALL⁽²⁷⁾ est égal à 0,74 et la valeur mesurée de l'incrément d'indice dans les conditions de l'expérience est 0,143. Avec un échantillon relativement peu polydispersé, nous avons trouvé une masse moléculaire moyenne en poids voisine de 3000 ($n \approx 10$ soit 30 résidus amino-acides). L'indice de viscosité mesuré pour différents échantillons préparés dans les mêmes conditions a toujours été trouvé de l'ordre de 10 ml.g^{-1} , dans un mélange chloroforme-acide dichloracétique 95-5 (v/v) à 25°C.

En ce qui concerne la conformation de ce polytripeptide à l'état solide, nous avons obtenu quelques indications en examinant son spectre d'absorption infra-rouge (dispersion dans une pastille de KBr).

	Amides A et B	Amide I	Amide II	Amide V
cm^{-1}	3290 et 3060	épaulements à 1694 et 1625	large 1540-1510	695

Tableau II: bandes d'absorption caractéristiques du polytripeptide $-(\text{Met-Met-Ala})_n$ (pastille KBr)

On distingue sur le tracé (fig.3) les bandes caractéristiques d'une structure β mais le profil de la bande amide II est trop mal défini pour qu'on puisse conclure à la présence d'une seconde structure ordonnée superposée à la première.

.../...

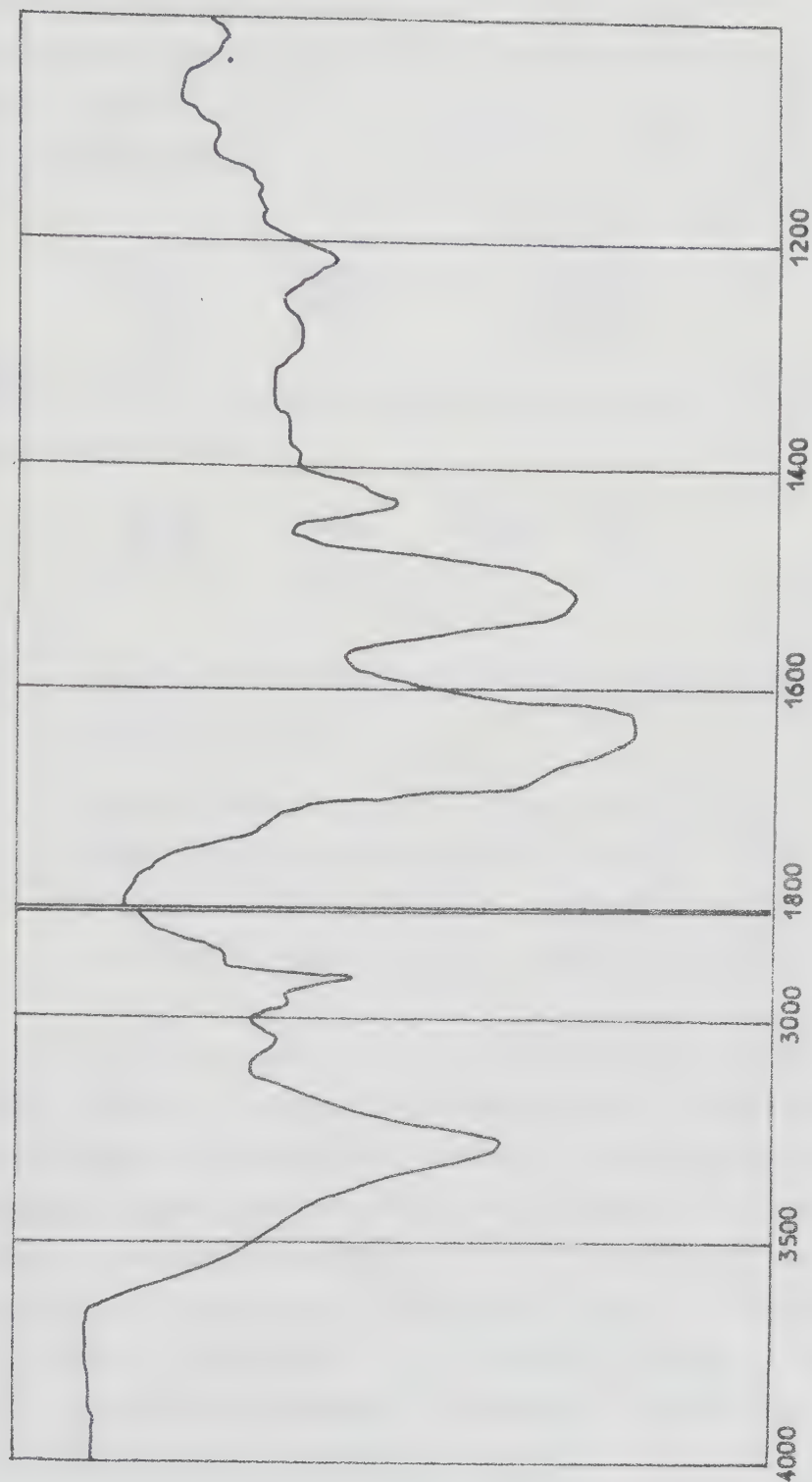


Fig.3 - Spectre d'absorption infrarouge d'un échantillon solide du
polytripeptide $\text{H}-(\text{Met-Met-Ala})_n-\text{OH}$ (dispersion dans KBr).

A l'état dissous des renseignements nous ont été fournis par l'étude de la dispersion du pouvoir rotatoire. Nous avons examiné entre 250 et 500 mμ le comportement du polypeptide dans un mélange chloroforme-acide dichloracétique 95-5 (v/v). Les valeurs trouvées pour le pouvoir rotatoire obéissent à l'équation de W.MOFFITT et J.T.YANG (²⁸) (équation [1]).

$$[R']_{\lambda} = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2} \quad \text{éq. [1]} .$$

où $[R']_{\lambda}$ est la rotation spécifique moyenne corrigée pour un résidu peptidique.

$$[R']_{\lambda} = \frac{3}{n^2 + 2} \cdot \frac{\overline{M}_o}{100} [\alpha]_{\lambda} \quad \text{éq. [2]} .$$

$[\alpha]_{\lambda}$ = pouvoir rotatoire spécifique pour un rayonnement de longueur d'onde λ .

$\overline{M}_o$ = valeur moyenne de la masse moléculaire des résidus contenus dans le polypeptide (ici $\overline{M}_o = 111$)

n = indice de réfraction du solvant pour la longueur d'onde λ , calculé à partir des données de G.D.FASMAN (²⁹).

En choisissant pour λ_o la valeur 212 mμ qui est ordinairement retenue lorsque le polypeptide ne contient pas d'autres chromophores optiquement actifs, c'est-à-dire asymétriquement perturbés, que les liaisons peptidiques, la représentation graphique de la grandeur $[R']_{\lambda} (\lambda^2 - \lambda_o^2)$ en fonction de $(\lambda^2 - \lambda_o^2)^{-1}$ conduit à un tracé rectiligne qui permet d'évaluer b_o à -225. En associant la valeur $b_o = -630$ à l'hélice α parfaite on obtient, par interpolation, un rapport d'hélicité H_M égal à 35%.

$$H_M = - \frac{b_o}{630} \times 100 \quad \text{éq. [3]} .$$

En fait, cette grandeur H_M n'a de sens que si l'on peut attribuer au coefficient b_o la valeur de - 630, pour la structure

.../...

α -hélicoïdale du polypeptide étudié. Dans ce travail, ce pourcentage apparent n'a été calculé qu'en vue de comparer les valeurs ainsi trouvées avec celles déterminées par une méthode parallèle.

Nous avons également cherché à interpréter nos courbes de dispersion rotatoire en nous fondant sur l'analyse plus récente proposée par E.SHECHTER et E.R.BLOUT (³⁰). Ces auteurs conseillent de représenter la variation de la grandeur $[R']_{\lambda}$ précédemment définie par une équation de DRUDE modifiée à deux termes:

$$[R']_{\lambda} = \frac{A(\alpha,\rho)193 \lambda^2_{193}}{\lambda^2 - \lambda^2_{193}} + \frac{A(\alpha,\rho)225 \lambda^2_{225}}{\lambda^2 - \lambda^2_{225}} \quad \text{éq. [4]}$$

où les constantes $A(\alpha,\rho)193$ et $A(\alpha,\rho)225$ que nous noterons dans la suite respectivement A_1 et A_2 tiennent simultanément compte de la contribution des formes hélicoïdale (symbole α) et désordonnée (symbole ρ) aux effets COTTON situés à 193,198 et 225 m μ , et où $\lambda_{193} = 193 \text{ m}\mu = \lambda_1$, $\lambda_{225} = 225 \text{ m}\mu = \lambda_2$. Ces nouveaux paramètres A_1 et A_2 permettent d'atteindre le taux d'hélicité $H_{S.B.}$ grâce à la relation [5].

$$H_{S.B.} = \frac{A_1 - A_2 + 650}{55,8} \quad \text{éq. [5]}$$

Nous avons déterminé les valeurs A_1 et A_2 pour l'échantillon polypeptidique en solution dans un mélange chloroforme-acide dichloracétique 95-5 et nous les avons trouvées égales à :

$$A_1 = 870 \quad A_2 = -680$$

Ces résultats satisfont à la relation

$$A_2 = -0,55 A_1 - B \quad \text{éq. [6]}$$

avec $B = 200$ donc bien compris entre 190 et 400 qui sont les valeurs limites trouvées par les auteurs lorsque la structure du soluté étudié ne contient pas d'autres conformations organisées que la forme α .

.../...

Le rapport d'hélicité H_{SB} que l'on tire de l'application de l'équation [5] est voisin de 38%. Ce résultat est comparable à celui que nous avons obtenu en appliquant l'équation de W.MOFFITT et J.T.YANG.

I.4 - CONCLUSIONS.

A la fin de ces premiers essais qui concernent la polycondensation du tripeptide HCl, HMet-Met-Ala ONp, il apparaît que nous n'avons pas obtenu le polymère très stéréorégulier que nous attendions.

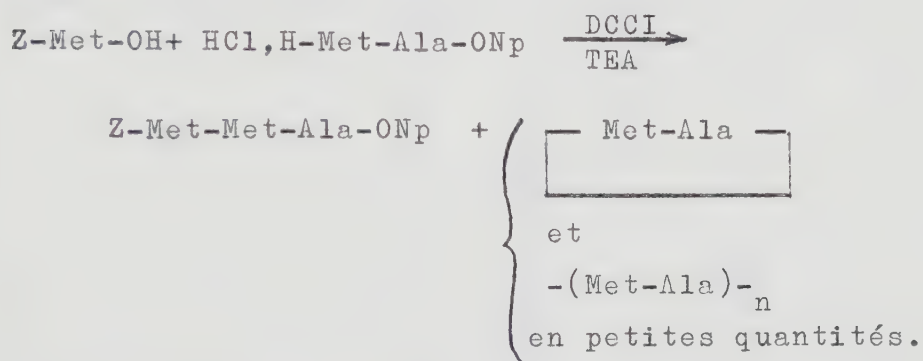
Dans tous les cas les produits synthétisés ont des masses moléculaires moyennes en poids relativement faibles ($M_w \# 3000$) et ils ne sont solubles que dans des milieux très actifs comme l'acide dichloracétique. L'examen spectroscopique infra-rouge effectué sur ces échantillons solides révèle principalement une structure β .

En premier lieu, nous avons observé que le chlorhydrate du tripeptide C-activé préparé par la méthode A (figure 1) était très hygroscopique et qu'il cristallisait difficilement. Nous avons tout d'abord attribué ce phénomène aux conditions brutales dans lesquelles le groupe N-protecteur était éliminé; en effet l'acide trifluoroacétique est hygroscopique; il n'est pas aisé de l'obtenir sous forme anhydre, et on peut penser que les traces d'eau ainsi introduites peuvent provoquer, à chaud, une hydrolyse partielle des fonctions peptidiques ou des groupes p.nitrophényliques (³¹).

Par ailleurs, nous rappellerons que nous n'accordons qu'une confiance limitée à la méthode que nous avons employée pour savoir si la voie utilisée pour la synthèse du tripeptide activé était capable ou non de provoquer une racémisation du produit obtenu.

Pour préciser ce point, nous avons tenté de préparer le même tripeptide par une seconde méthode (B) qui a été préconisée par M.GOODMAN et K.C.STUEBEN (³²) et qui consiste à reproduire la

suite des condensations faite dans le procédé A en opérant dès le départ sur l'ester p.nitrophénylique de l'alanine (fig.4). Mais nous nous sommes alors heurté à une difficulté lors de l'étape conduisant au tripeptide. Il se trouve en effet que dans ce cas particulier, et ainsi que l'ont déjà rapporté d'autres auteurs ⁽³³⁾, la condensation recherchée entre en compétition avec la cyclisation en dicétopipérazine provoquée par l'aminolyse intramoléculaire qui se produit lorsque l'on neutralise par la triéthylamine le chlorhydrate activé HCl, H-Met-Ala-ONp.



Nous avons donc provisoirement abandonné la synthèse du tripeptide par la méthode B, pour nous intéresser à la polycondensation d'un dipeptide activé, en nous attachant tout particulièrement à contrôler sa stéréorégularité. De plus pour éviter les inconvénients présentés par le groupe benzyloxycarbonyl lorsqu'il se trouve fixé sur des peptides contenant de la méthionine nous avons recherché un autre groupe N-protecteur qui puisse être débloqué sans entraîner de réactions secondaires sur le groupe thioéther latéral et qui possède les mêmes avantages (cristallinité des dérivés, structure ne favorisant pas la formation d'une oxazolone pendant une condensation) que le groupe benzyloxycarbonyl.

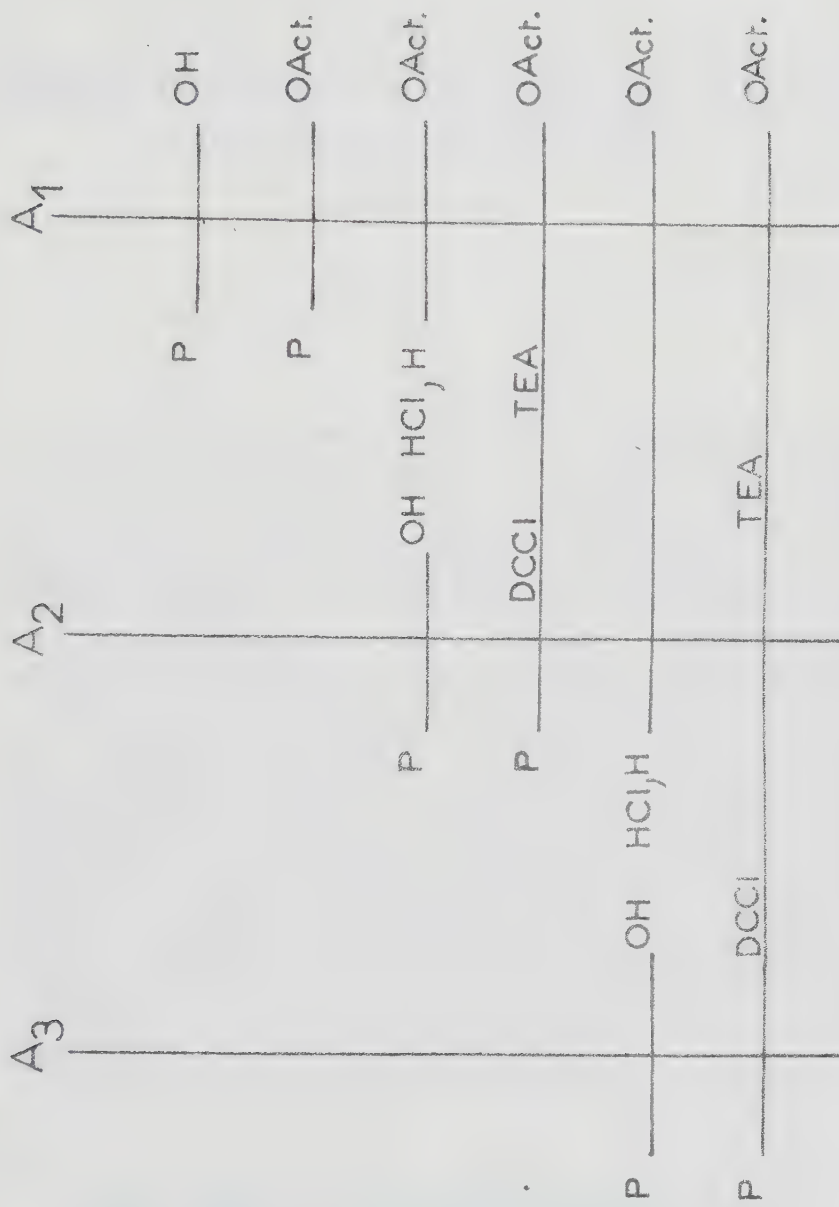


Fig.4: Méthode B

Schéma de la méthode B appliquée à la synthèse d'un tripeptide.

DEUXIEME PARTIE

SYNTHESE ET ETUDE D'UN POLYDIPEPTIDE DOUE D'UNE HAUTE REGULARITE STERIQUE

Ayant mis en cause la pureté chimique et la pureté optique du tripeptide qui avait été utilisé comme monomère, pour expliquer les caractéristiques relativement médiocres des polymères obtenus, nous avons jugé nécessaire de contrôler de façon plus rigoureuse la structure des intermédiaires oligopeptidiques dont nous provoquons finalement la polycondensation. Ces vérifications sont évidemment plus faciles à faire sur des dipeptides que sur des tripeptides. C'est pourquoi, nous avons entrepris des essais de polycondensation sur des dipeptides* malgré le risque de cyclisation que présente alors l'étape terminale de la synthèse. Il semblait d'ailleurs, d'après certains auteurs (^{9e}) que l'on disposait de quelques moyens pour limiter cette réaction secondaire.

II-1. CHOIX DE LA SEQUENCE DIPEPTIDIQUE

Pour obtenir un copolypeptide de méthionine et d'alanine, on peut envisager de polycondenser l'un ou l'autre des deux

.../...

*Ce travail a été effectué, en partie, en collaboration avec Messieurs G. BOUSSARD (^{9f}) et P. HUBERT (³⁴) du laboratoire de Chimie - Physique Macromoléculaire - E.N.S.I.C., Nancy.

esters activés HCl,H-Met-Ala-ONp ou HCl,H-Ala-Met-ONp. Mais, ainsi que nous l'avions observé (cf partie I.3) pour les tripeptides terminés par le résidu méthionyle, il nous est apparu que les dérivés du composé H-Met-Ala-OH sont généralement bien plus faciles à isoler et à purifier que ceux qui correspondent à la séquence H-Ala-Met-OH. C'est pourquoi, nous avons choisi de préparer le chlorhydrate de l'ester p.nitrophénylique de la méthionyl-alanine (HCl,H-Met-Ala-ONp) en partant des acides aminés de configuration L.

II. 2 - SYNTHÈSE ET CONTRÔLE DE LA PURETÉ OPTIQUE DU DIPEPTIDE C-ACTIVE.

II.2.1.- Préparation du dipeptide

Nous avons choisi d'effectuer la réaction de condensation des résidus méthionyle et alanyl (cf.figure 5a) selon la méthode B, c'est-à-dire en opérant sur l'ester p.nitrophénylique de l'alanine et non pas sur son ester méthylique comme dans la synthèse du tripeptide décrite dans la Ière Partie. On obtient ainsi directement le dipeptide activé sans qu'il soit nécessaire de procéder ultérieurement à l'hydrolyse alcaline de la fonction ester méthylique, et à la condensation du groupe carboxylique ainsi libéré sur le p.nitrophénol. Il est avantageux d'éviter ces deux dernières transformations parce qu'elles sont susceptibles d'entraîner une inversion partielle du signe optique du segment alanyl terminal. En effet, la première s'effectue en milieu basique (inversion possible par formation d'un carbanion) et la seconde exige de traiter un dipeptide à fonction carboxylique libre par la dicyclohexylcarbodiimide (cyclisation possible en oxazolone de l'intermédiaire ainsi activé ,cf.figure 6). Il va de soi que l'option choisie n'est possible que parce que l'étape de condensation des deux réactifs mis en présence est bien plus rapide que l'aminolyse de l'ester p.nitrophénylique de l'alanine. Ces circonstances font que l'on n'observe pas la formation de quantités appréciables de polyalanine ou de dicétopipérazine correspondante.

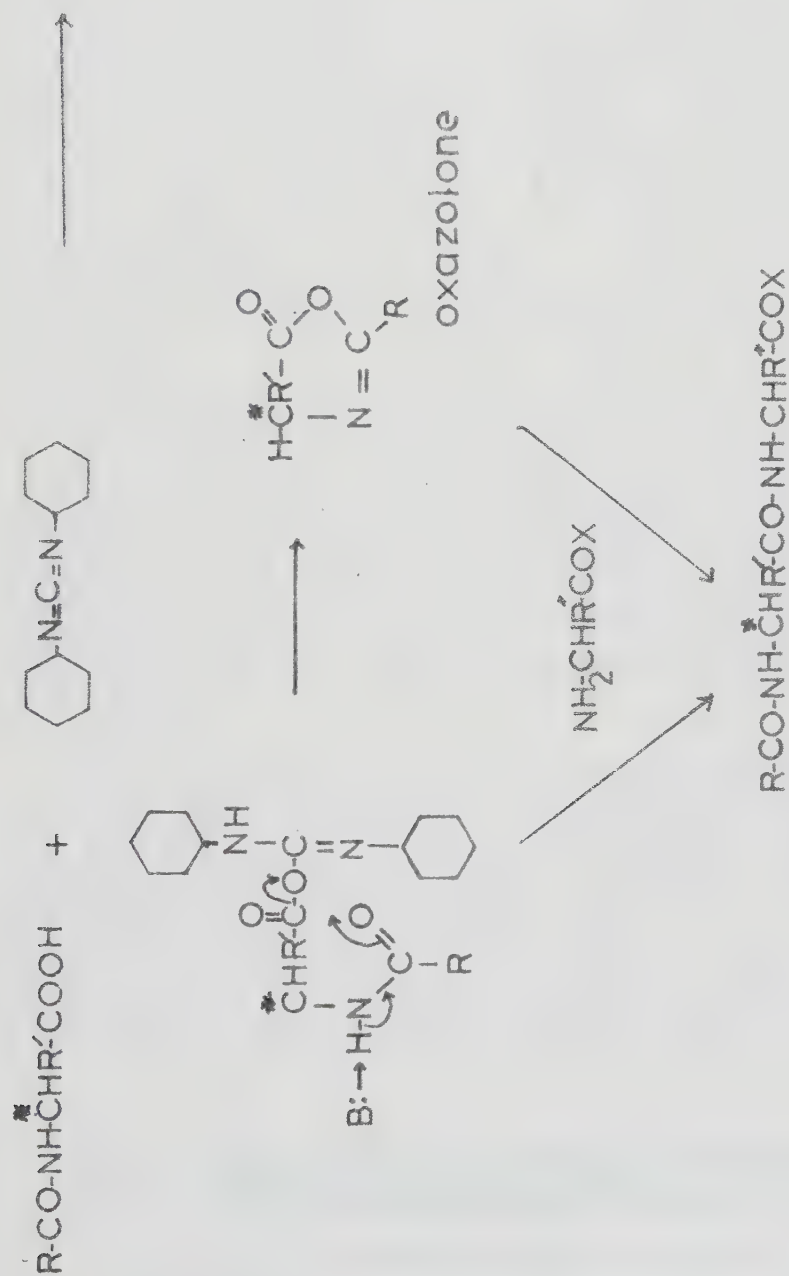
.../...

Met		Ala	
		NPS	OH
		NPS	ONp
NPS	OH DCHA	HCl, H	ONp
NPS	DCCI		ONp
HCl, H	HCl / MeOH		ONp

Fig.5a - Synthèse du chlorhydrate de dipeptide activé par la méthode B.

Met		Ala	
NPS	OH DCHA	HCl, H	OMe
NPS	DCCI		OMe
NPS	NaOH		OH
NPS	HONp DCCI		ONp

Fig. 5b - Synthèse du dipeptide activé par la méthode A.



* C : carbone asymétrique susceptible de subir une inversion de signe optique pendant la condensation).

Fig.6 - Mécanisme de formation de l'oxazolone pendant une condensation à l'aide de la dicyclohexylcarbodiimide.

En ce qui concerne le groupe protecteur de la fonction amine, nous avons eu recours au substituant o.nitrophénylsulfényle⁽³⁵⁾ (NPS-). Ce groupe qui est dépourvu d'atomes fortement électro-négatifs ne favorise pas la formation d'intermédiaires cycliques analogues aux oxazolones et lorsqu'on prend la précaution de faire des condensations entre un acide aminé ainsi protégé et un autre acide aminé ou un peptide C-protégés, il n'y a aucun risque de racémisation. En ce sens ce groupe est doué de propriétés comparables à celles du substituant benzyloxycarbonyl, et il présente sur ce dernier, l'avantage de pouvoir être éliminé très aisément par simple contact avec une solution méthanolique d'acide chlorhydrique. A ce propos, il faut préciser que l'élimination n'exige qu'un contact de quelques minutes avec la solution méthanolique et ne s'accompagne donc pas d'une transestérification importante de la fonction ester p.nitrophénylique.

Par ailleurs le substituant o.nitrophénylsulfényle est facilement repérable par son absorption dans l'ultra-violet et le visible, ce qui permet une détection rapide que ce soit dans des opérations de contrôle chromatographique ou spectroscopique (pour vérifier par exemple que le déblocage d'une fonction amine est total).

Enfin nous préciserons que le chlorhydrate de dipeptide activé peut être facilement recristallisé dans l'acétonitrile pur et qu'on l'obtient sous forme d'aiguilles incolores. De plus contrairement au chlorhydrate décrit dans la première partie, il n'est pas hygroscopique et l'analyse élémentaire révèle un taux de chlore qui est en accord avec la valeur théorique.

II.2.2.-Contrôle de la pureté optique des monomères . Comparaison des méthodes A et B.

Il n'existe aucune méthode générale pour s'assurer que la condensation de deux amino-acides s'est effectuée sans altération des signes optiques des deux centres asymétriques qui se trouvent réunis dans le dipeptide ainsi synthétisé.

Les contrôles que l'on peut effectuer sur les hydrolysats sont peu sûrs et très peu sensibles. Certains auteurs (³⁶) ont eu recours à la résonance magnétique nucléaire pour détecter la présence d'un diastéréoisomère, mais le procédé est assez peu précis.

On peut également envisager de préparer un même dipeptide par deux voies différentes et de comparer les pouvoirs rotatoires des deux composés ainsi obtenus. C'est précisément cette méthode qui a déjà été employée dans notre laboratoire (³⁷) dans le cas du dipeptide activé NPS-Met-Ala-ONp. Nous rappellerons qu'après avoir synthétisé ce dérivé par les procédés A et B nous avons observé que le pouvoir rotatoire des deux réactifs ainsi préparés étaient assez nettement différents, ce qui prouvait que l'une des deux méthodes au moins provoquait la racémisation.

La chromatographie est également une technique utile pour révéler la présence d'épimères. On peut opérer en phase gazeuse à condition de disposer d'amino-esters N-trifluoroacétylés, ce qui exige des réactions préalables de substitution. Plus simple, l'élution sur papier est une méthode relativement sensible qui a été employée avec succès dans le cas des réactifs dipeptidiques (³⁸) et plus rarement dans celui des tripeptides (³⁹).

C'est finalement ce dernier procédé que nous avons retenu bien qu'il présentât, pour nous, quelques inconvénients dus au fait que nous avions l'intention de l'utiliser avec des esters actifs. En effet le problème le plus important que nous avions à résoudre était d'apprécier la stéréospécificité de l'étape d'activation du peptide étudié. Ces circonstances nous ont conduit à quelques précautions dans le choix des éluants puisque tout contact avec un composé nucléophile aurait provoqué une transformation chimique du soluté examiné.

Résultats expérimentaux-

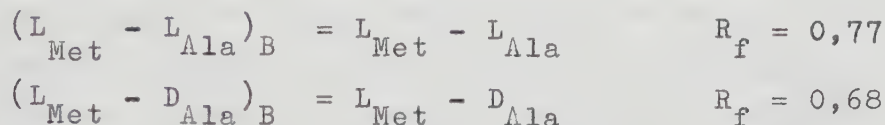
Toutes les chromatographies ont été faites sur couches minces de silice de 0,25 mm d'épaisseur (DC Plastikfolien Keeselgel F₂₅₄ MERCK)

.../...

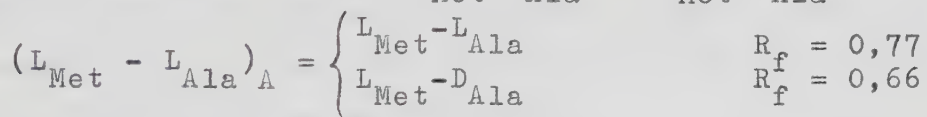
Lors d'une première expérience, nous avons préparé le dipeptide activé NPS-Met-Ala-ONp par la méthode B que l'on considère généralement comme stéréospécifique, en utilisant dans un premier essai des acides aminés L, et dans un second la L-Méthionine et la D-Alanine; nous noterons respectivement les produits obtenus dans les deux cas:



En réalisant des mélanges artificiels de ces deux diastéréoisomères, nous avons pu nous assurer qu'ils peuvent être séparés en utilisant un éluant mixte éther éthylique-acide acétique 20-0,2 (en volumes). Dans ces conditions, les R_f des deux réactifs sont:



La même expérience a été reproduite avec un dipeptide activé préparé par la méthode A et que nous noterons $(L_{Met} - L_{Ala})_A$ (figure 5b). Le résultat de cet essai a effectivement confirmé que ce procédé de synthèse provoque une racémisation partielle du résidu alanyle. En effet, le chromatogramme révèle la présence de deux diastéréoisomères dont les R_f sont pratiquement égaux à ceux des dérivés $L_{Met} - L_{Ala}$ et $L_{Met} - D_{Ala}$



Le mélange binaire des deux épimères peut donc être dosé par une simple mesure de pouvoir rotatoire:

$$[\alpha]_{(L-L)}_A = x [\alpha]_{(L-L)}_B + (1-x) [\alpha]_{(L-D)}_B$$

$[\alpha]$ étant le pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans des conditions (température, solvant, longueur d'onde) bien déterminées.

Nous avons trouvé $x = 68 \%$ ce qui prouve que la méthode de synthèse A appliquée au cas qui nous intéresse, provoque, dans

.../...

les conditions où nous avons opéré, l'inversion optique de 32% des centres asymétriques contenus dans les résidus alanyle.

Une étude complémentaire a été entreprise en vue de déterminer l'étape (saponification ou estérification par le p.nitrophénol) qui est responsable de ce phénomène. A cette fin, nous avons étudié le produit obtenu immédiatement après saponification de l'ester méthylique du dipeptide.

Nous avons vérifié qu'il était effectivement possible de séparer par chromatographie les deux diastéréoisomères Z-LMet-LAla-OH et Z-LMet-DAla-OH préparés en utilisant de la D,L-Alanine au lieu de l'isomère L, et nous avons constaté que le produit obtenu en saponifiant l'ester Z-LMet-LAla-OMe ne donnait naissance qu'à une seule tache. Nous en avons conclu que ce n'était pas là l'étape qui provoquait la racémisation et que celle-ci devait vraisemblablement se produire au cours de la condensation sur le p.nitrophénol, en présence de dicyclohexylcarbodiimide. Il est probable que la formation d'oxazolone soit à mettre en cause ainsi que l'indique le processus qui est représenté sur la figure 6.

Nous avons cherché à confirmer ce mécanisme par spectroscopie infra-rouge en tentant d'observer la bande d'absorption caractéristique des oxazolones (¹⁵) à 1832 cm^{-1} . En effet, le dipeptide Z-Met-Ala-OH est transparent dans le domaine de fréquences compris entre 1800 et 1850 cm^{-1} et il en est de même de la dicyclohexylcarbodiimide.

L'expérience montre que le mélange des deux réactifs s'accompagne effectivement de la formation immédiate d'espèces qui absorbent fortement à 1830 cm^{-1} . Toutefois, il ne faut pas conclure trop rapidement à la présence d'oxazolone puisque ce même phénomène peut être observé quand on opère avec le réactif

NPS-Met-OH qui ne peut pas donner naissance à l'azlactone. Il apparaît donc que d'autres intermédiaires peuvent être mis en cause pour expliquer la forte absorption qui se manifeste dans cette région du spectre.

.../...

II-3. - CONDITIONS DE POLYCONDENSATION ET SEPARATION DES FRACTIONS.

Tous les essais de polycondensation du chlorhydrate de dipeptide ont été effectués en solution très concentrée dans le chloroforme (4 ml de chloroforme pour 10 mM du dipeptide) en présence d'une quantité stoechiométrique de triéthylamine.



La réaction fut indifféremment poursuivie pendant 48 heures ou 72 heures, sans qu'il en résulte des différences appréciables dans les polycondensats obtenus.

A la fin de l'opération, le milieu réactionnel est dilué par addition de quelques millilitres de chloroforme et en évapore à sec. Le résidu est repris par l'eau de façon à éliminer le chlorhydrate de triéthylamine et le p.nitrophénol libéré, broyé et centrifugé. On le lave de la même façon à l'alcool et à l'éther. Une fois bien séché, il représente environ 50% du rendement théorique. Ce polycondensat brut peut être séparé ultérieurement en trois fractions. Par extraction à l'alcool éthylique chaud, on isole une partie qui représente 20 à 30% en poids du polymère traité. Elle est constituée en majeure partie par de la dicétopipérazine d'alanine et de méthionine dont une certaine quantité a d'ailleurs pu être déjà éliminée lors du précédent lavage à l'éthanol. Le spectre infra-rouge de ce composé présente à 3200 cm^{-1} une bande amide A et on n'y discerne aucune absorption correspondant au maximum amide II qui apparaît lorsque les liaisons amide sont en conformation trans. Ce composé est tout à fait comparable à la pipérazine dione-2,5 que l'on peut aisément préparer par cyclisation de l'ester p.nitrophényle de la méthionyl-alanine en solution diluée (F = 225°C) (37).

Une deuxième fraction peut être extraite par le chloroforme: elle représente dans tous les cas environ 40 % du polymère brut

(soit 20% du rendement théorique) et se dissout également dans l'hexaméthylphosphorotriamide.

Enfin, le résidu qui est insoluble dans les solvants usuels, ne se dissout que dans les acides forts.

Signalons que dans le laboratoire (³⁷), un essai de polycondensation a été effectué en milieu très concentré dans le diméthylformamide (10 mM de dipeptide activé, initialement dissous dans 2 ml de solvant). Le rendement atteint à l'issue de cette expérience est élevé ($\text{Rend}^t = 60\%$) mais le copolypeptide ainsi préparé est moins soluble que les précédents, les fractions extractibles par le chloroforme et l'hexaméthylphosphorotriamide ne correspondant respectivement qu'à 5 et 20% en poids du polymère brut.

II.4 - ETUDE DE LA FRACTION SOLUBLE DANS LE CHLOROFORME.

Nous avons examiné d'une façon plus approfondie la fraction soluble du polycondensat, après lui avoir fait subir un lavage prolongé à l'éthanol chaud de façon à éliminer toute trace de dicétopipérazine.

II.4.1.- Détermination des masses moléculaires

Les masses moléculaires moyennes en nombre $\overline{M}_n$ ont été déterminées par tonométrie (osmométrie à tension de vapeur) en opérant à 25°C sur des prises d'essai dissoutes dans le chloroforme. Il faut cependant remarquer, qu'on est limité dans cette méthode à des masses moléculaires inférieures à 20.000 et que par ailleurs la valeur de $\overline{M}_n$ déduite de mesures tonométriques est souvent très inférieure à celle qui est mesurée par d'autres méthodes; ceci provient du fait que l'osmométrie à tension de vapeur est très sensible à la présence de petites masses dans l'échantillon. Selon les cas, ces masses moyennes en nombre ont été trouvées égales à des valeurs comprises entre 10 000 et 15 000.

.../...

Les masses moyennes en poids $\overline{M}_p$ ont été obtenues par sédimentation en étudiant l'équilibre atteint, à 20°C, par centrifugation d'une solution du polycondensat dans l'hexaméthylphosphorotriamide. Le volume spécifique a été calculé d'après E.J.COHN et J.T.EDSALL⁽²⁷⁾ et trouvé égal à 0,74. Les résultats de ces mesures ont toujours été compris entre 20.000 et 35.000 ce qui correspond à un enchaînement contenant approximativement 300 résidus amino-acides.

II.4.2. Viscosités.

Les indices de viscosité ont été déterminés à 25°C en répétant l'opération avec des solvants binaires chloroforme-acide dichloracétique de composition variable. Les résultats obtenus qui sont rassemblés sur le tableau III et la figure 7 mettent assez clairement en évidence l'agrégation qui se produit dans des mélanges riches en chloroforme.

Néanmoins on peut considérer comme assez caractéristique la

Composition CHCl ₃ -ADCA	100-0	95-5	75-25	50-50	25-75	0-100
$[\eta]$ ml.g ⁻¹	-	166	138	124	122	116

Tableau III:Indices de viscosité du polypeptide dans des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable.

valeur trouvée dans des mélanges contenant plus de 50% d'acide. En effet, au delà de cette limite, la viscosité intrinsèque demeure pratiquement invariante. Elle est encore nettement supérieure à 100 ml.g⁻¹ ce qui confirme que le soluté polypeptidique a un poids moléculaire élevé.

II.4.3.-Conformation

Nous avons porté une attention toute particulière à la fraction qui est soluble dans le chloroforme. Par évaporation

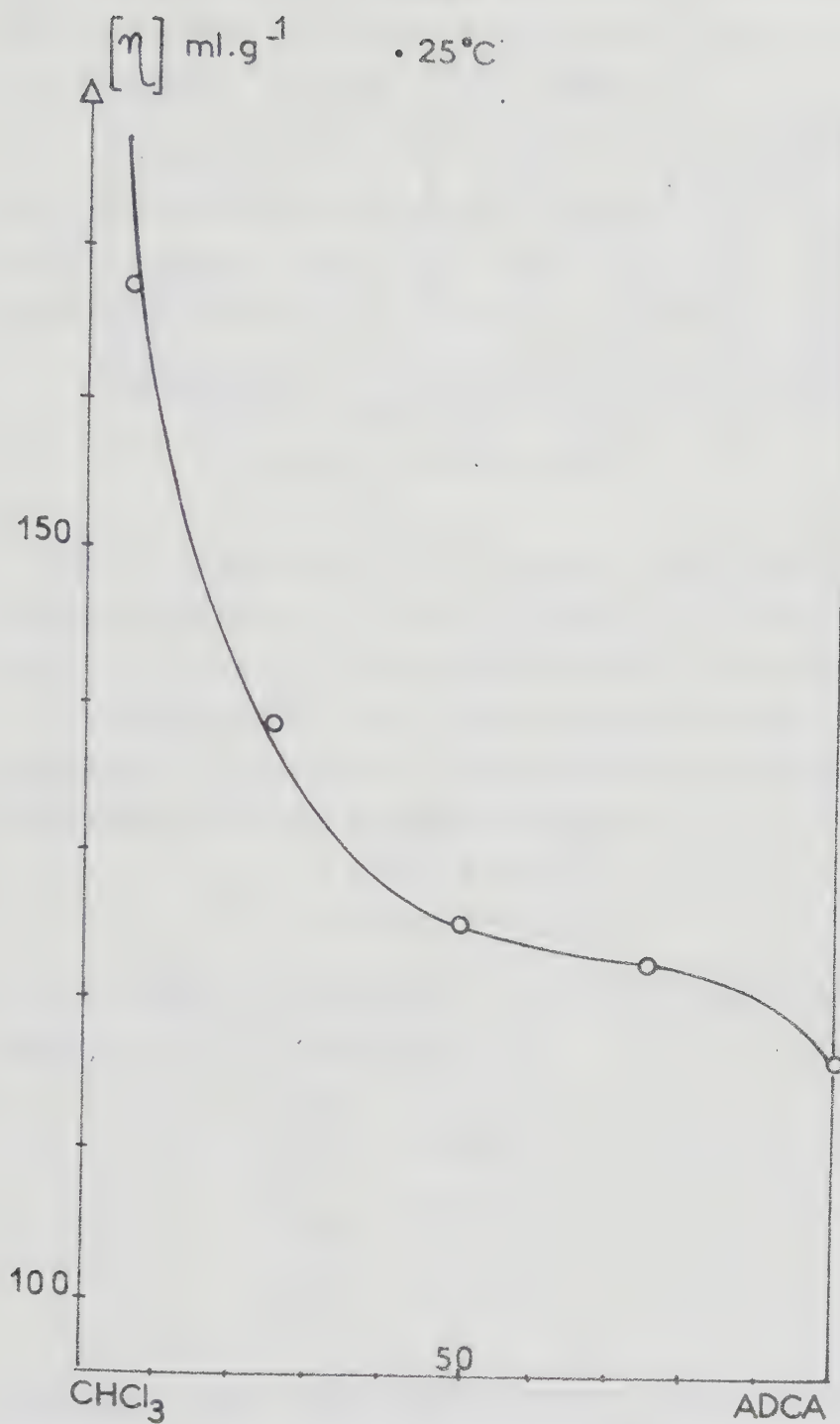


Fig.7 - Variation de la viscosité intrinsèque du polydipeptide $\text{H}-(\text{Met-Ala})_n\text{-OH}$ en fonction de la composition du mélange chloroforme-acide dichloracétique.

sur un disque de bromure de potassium, on forme facilement un film qui peut être examiné par spectrométrie infra-rouge. Le spectre obtenu révèle sans ambiguïté l'existence d'une structure α -hélicoïdale (Tableau IV et figure 8).

	Amides A et B	Amide I	Amide II	Amide V
cm ⁻¹	3290 et 3060	1654	1544	620

Tableau IV: bandes d'absorption caractéristiques du polydipeptide $-(\text{Met-Ala})_n$ en spectroscopie infra-rouge. (film sur pastille KBr).

Cette conclusion s'est trouvée confirmée par l'étude radio-cristallographique * qui nous avons pu faire sur des fibrilles obtenues à partir d'un collodion dans le chloroforme.

La distribution des taches équatoriales (voir cliché dans l'Annexe II) peut être interprétée en envisageant un réseau hexagonal dont les paramètres sont:

$$a = 10,94 \pm 0,02 \text{ \AA}$$

$$c = 26,0 \pm 0,02 \text{ \AA}$$

ce qui permet de justifier de l'existence d'interférences correspondant aux espacements:

$$d_{003} = 8,60 \text{ \AA}$$

$$d_{105} = 4,56 \text{ \AA}$$

$$d_{103} = 6,37 \text{ \AA}$$

$$d_{108} = 3,11 \text{ \AA}$$

Certaines réflexions relativement intenses n'ont pu être indexées et nous posent encore quelques problèmes relativement à la structure de ce polymère. Il s'agit par exemple de deux interférences méridiennes associées respectivement aux distances $d = 1,493 \text{ \AA}$ et $2,60 \text{ \AA}$ et de deux taches ($d = 6,23 \text{ \AA}$ et $d = 5,30 \text{ \AA}$) situées sur les strates 4 et 5.

.../...

* L'étude radiocristallographique a été faite en collaboration avec F.COLONNA-CESARI du Laboratoire de Biophysique de l'Université I de NANCY (Pr.P.HORN).

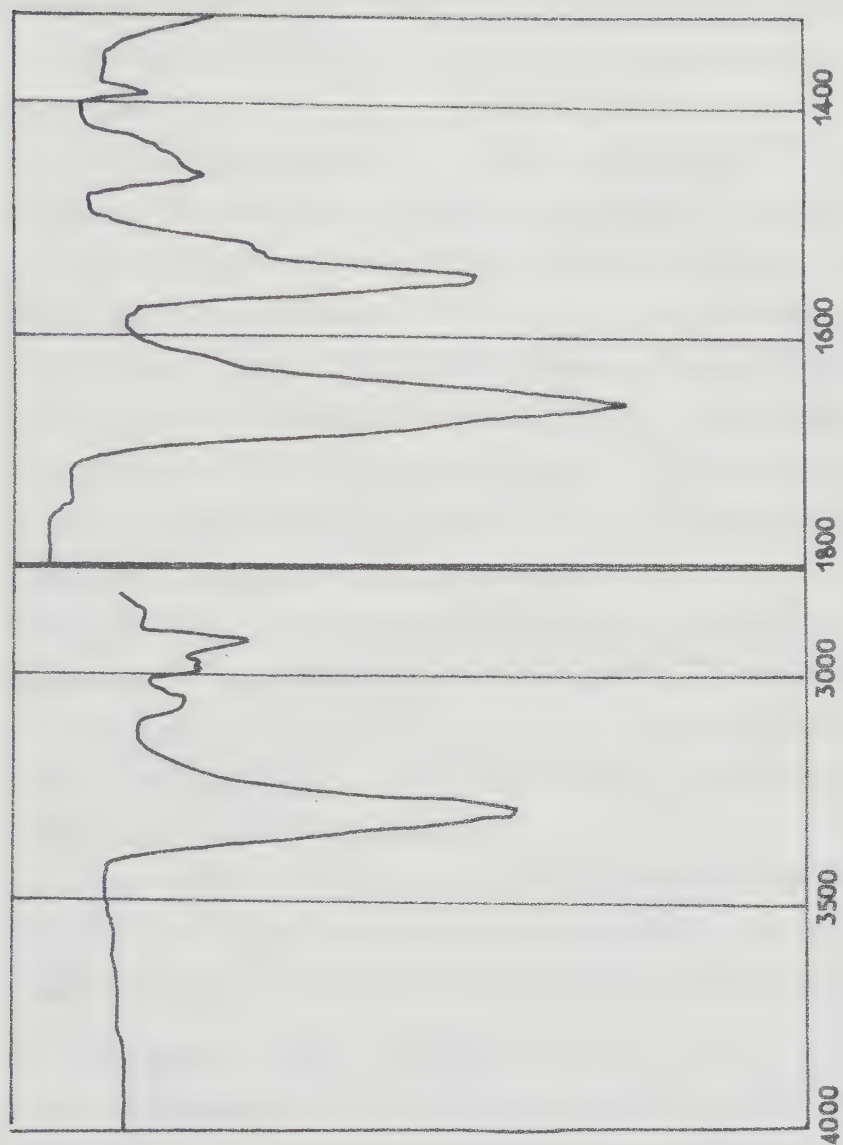


Fig.8 - Spectre d'absorption infra-rouge d'un film du
polydipeptide H-(Met-Ala)_n-OH

Précisons que le cliché que nous décrivons a été observé avec un échantillon non recuit et que l'on note certaines modifications lorsque les fibres sont chauffées à 70°C.

En ce qui concerne la structure en solution nous avons constaté que la dissolution de ce produit dans le chloroforme ne s'accompagne d'aucune modification importante du spectre infrarouge ce qui montre que la conformation reconnue à l'état solide demeure inchangée lorsque le copolypeptide est dissous dans ce solvant.

Cette conclusion a pu être confirmée en étudiant la dispersion du pouvoir rotatoire présentée entre 250 et 500 mμ, par des solutions du polydipeptide dans des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable. Les résultats de ces mesures satisfont à l'équation [1]-définie dans la partie I.3.3. - de W.MOFFITT et J.T.YANG, et en opérant comme il y a été indiqué, nous avons calculé les valeurs de b_0 ainsi que le taux d'hélicité H_M défini par l'équation [3] pour les différentes solutions du polymère.

Parallèlement, nous avons également cherché à appliquer la méthode de E.SHECHTER et E.R.BLOUT⁽³⁰⁾ et nous avons calculé les valeurs de $A_1, A_2, H_{S.B.}$ et B respectivement par les équations [4], [5] [6], pour chacun des mélanges chloroforme-acide dichloracétique considéré.

Dans le tableau V, nous avons rassemblé toutes ces grandeurs et nous en avons reporté la variation en fonction de la composition en acide dichloracétique sur les figures 9 et 10.

On remarquera tout d'abord que les valeurs de B sont légèrement inférieures à la limite trouvée par E.SHECHTER et E.R.BLOUT⁽³⁰⁾ sans que l'on puisse cependant accorder à ce fait une signification précise.

Par ailleurs, on notera également que les taux d'hélicité H_M et $H_{S.B.}$ très voisins l'un de l'autre restent élevés dans des mélanges riches en acide dichloracétique, ce qui traduit une grande stabilité de la structure α -hélicoïdale dans ce solvant pourtant très actif.

.../...

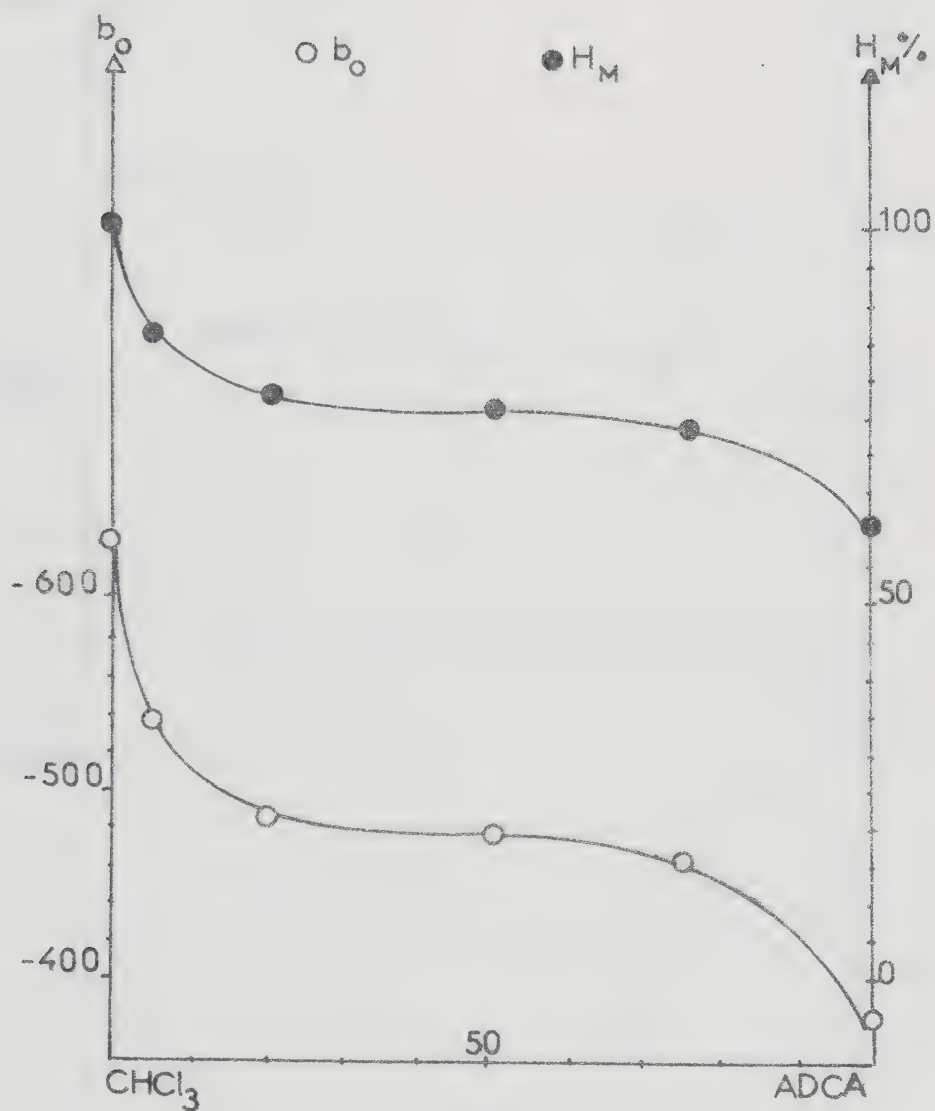


Fig.9 - Polydipeptide $H(\text{Met-Ala})_n\text{-OH}$: variation des paramètres de W.MOFFITT en fonction de la composition du mélange chloroforme- acide dichloracétique.

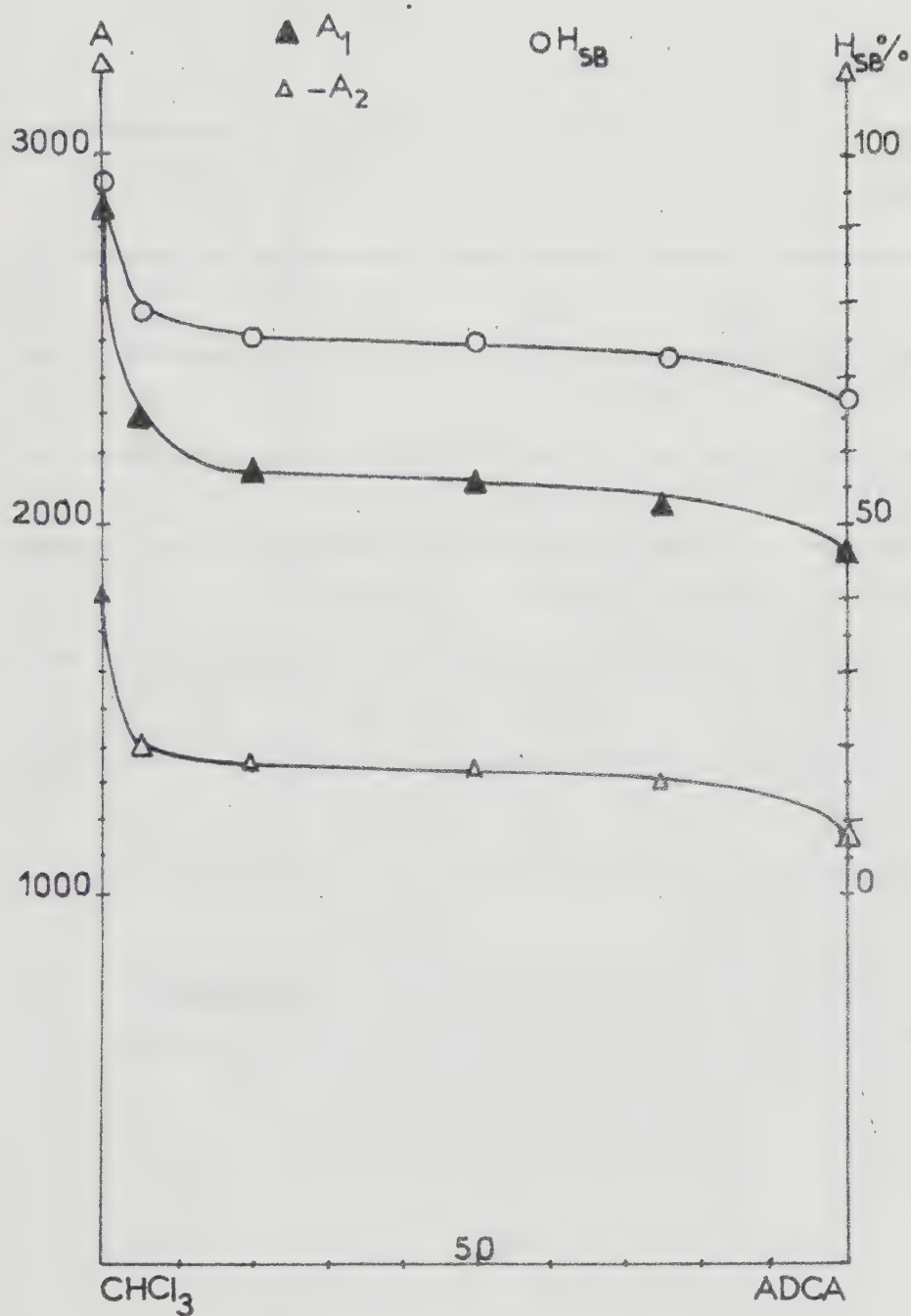


Fig.10 - Polydipeptide H-(Met-Ala)_n-OH: variation des paramètres de E.SHECHTER et E.R.BLOUT en fonction de la composition du mélange chloroforme-acide dichloracétique.

Composition CHCl ₃ -ADCA	100-0	95-5	80-20	50-50	25-75	0-100
b _o	-625	-530	-480	-475	-460	-385
H _M %	99	84	76	75	73	61
A ₁	+2910	+2310	+2175	+2170	+2100	+1900
A ₂	-1800	-1400	-1370	-1335	-1295	-1185
H _{S.B.} %	96	78	75	74	72	67
B	197	133	179	139	140	138

Tableau V: Valeurs des différents paramètres de dispersion rotatoire optique pour des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable.

Cette propriété avait déjà été observée par G.E.PERLMANN et E.KATCHALSKI⁽⁴⁰⁾ pour des solutions de poly L-Méthionine dans des acides forts comme l'acide dichloracétique. Enfin la valeur élevée du taux d'hélicité en solution chloroformique confirme les résultats obtenus par l'examen du spectre infra-rouge effectué dans ce même solvant.

II.5 - CONCLUSIONS

Pour préparer un polydipeptide de méthionine et d'alanine, nous avons synthétisé un monomère activé en appliquant la méthode récurrente de condensation par la dicyclohexylcarbodiimide et en partant de l'ester p.nitrophénylique de la L-Alanine. Ce procédé nous a permis d'obtenir directement le dipeptide recherché sans avoir besoin de procéder, comme nous l'avions fait lors de la préparation du tripeptide décrit dans la Ière Partie, à l'hydrolyse d'une fonction ester méthylique et à la condensation du groupe carboxyle ainsi libéré sur le p.nitrophénol. Rappelons cependant que ce procédé n'est généralisable que dans la mesure où la condensation des deux segments est plus rapide que l'aminolyse de la fonction ester activé. En utilisant comme groupe N-protecteur le substituant o.nitrophénylsulfényle, nous avons évité les inconvénients rencontrés lorsque l'on veut libérer la fonction amine d'un résidu méthionyle, protégée par le groupe benzyloxycarbonyle.

Par une étude chromatographique approfondie, nous avons vérifié que le dipeptide ainsi préparé était optiquement pur, ce qui n'est pas le cas, lorsqu'il est synthétisé par la voie qui procède par l'intermédiaire de l'ester méthylique.

Comme l'on s'y attendait, la polycondensation du chlorhydrate de dipeptide activé, bien qu'elle ait été effectuée en milieu très concentré, a fourni une quantité notable de dicétopipérazine; cependant, une part importante (40%) du produit brut était soluble dans le chloroforme, et les mesures de l'indice de viscosité et de la masse moléculaire nous ont montré

que cet échantillon correspondait à des enchaînements de 300 restes amino-acide environ.

Par ailleurs, l'étude spectroscopique et optique de la solution chloroformique nous a montré que le soluté macromoléculaire en question adoptait une conformation α -hélicoïdale régulière.

Quand on compare ces résultats à ceux que nous avons eus en polycondensant le tripeptide activé, on constate que l'inconvénient que constitue la diminution de rendement due à la formation de dicétopipérazine est largement compensé par les caractéristiques très satisfaisantes de la fraction polypeptidique que l'on isole finalement.

Nous y trouvons la preuve qu'il faut accorder une grande attention à la pureté optique et chimique des monomères intermédiaires qui sont utilisés dans la synthèse des copolypeptides de haut poids moléculaire.

Il apparaît alors évident que la mise au point de méthodes permettant la préparation d'oligopeptides activés plus longs et optiquement purs permettrait d'obtenir des polymères stéréoréguliers avec des rendements élevés.

TROISIEME PARTIE

SYNTHESE ET ETUDE D'UN POLYTRIPÉPTIDE DOUE D'UNE HAUTE
REGULARITE STERIQUE; EXTENSION DU PROCEDE A LA SYNTHESE
D'UN POLYTETRAPÉPTIDE.

On peut espérer préparer un tripeptide activé optiquement pur en poursuivant la réaction de condensation progressive suivant la méthode B:



Néanmoins l'expérience montre qu'une nouvelle difficulté apparaît, qui est due au fait que cette réaction entre en compétition avec un processus secondaire qui résulte de l'aminolyse intramoléculaire du dipeptide activé



III.1- SYNTHESE ET ETUDE DU POLYTRIPÉPTIDE

III.1.1- Préparation du tripeptide activé

Le problème qui vient d'être posé a été résolu en tirant parti de l'observation, suivant laquelle on pouvait éviter

.../...

d'avoir à procéder la neutralisation du chlorhydrate par addition de triéthylamine, en introduisant le nouvel amino-acide sous forme de sel de dicyclohexylammonium.

C'est ainsi que par condensation du sel de dicyclohexylammonium de la méthionine dont l'extrémité amine a été préalablement protégée par action du chlorure d'O.nitrophénylsulfényle, sur le chlorhydrate du dipeptide activé HCl,H-Met-Ala-ONp, on peut obtenir le tripeptide avec un excellent rendement et sans observer la formation de dicétopipérazine (figure 11). La réaction est effectuée dans le chloroforme, en dissolvant à chaud NPS-Met-OH,DCHA, en refroidissant ensuite et en ajoutant rapidement et dans l'ordre la dicyclohexylcarbodiimide et le chlorhydrate de dipeptide activé.

Nous avons également préparé ce même oligopeptide C-activé en utilisant la méthode A décrite dans la figure 1 et en remplaçant le groupement benzyloxycarbonyle (Z-) par le substituant O.nitrophénylsulfényle.

Les sulfenamides étant sensibles, à l'action des milieux acides et alcalins, il faut prendre quelques précautions au cours de la saponification de l'ester méthylique NPS-Met-Met-Ala-OMe. Il suffit de suivre par chromatographie l'évolution de cette réaction et d'extraire l'acide dès qu'elle est parvenue à son terme (durée 1 heure à 0°C).

Comme dans le cas du dipeptide, nous avons entrepris une étude chromatographique (³⁴) des oligopeptides synthétisés afin de déterminer leur pureté optique; nous avons donc été conduit à préparer les échantillons suivants:

$(L_{Met}-L_{Met}-L_{Ala})_B$ = tripeptide activé NPS-Met-Met-Ala-ONp synthétisé par la méthode B à partir des acides aminés L.

$(L_{Met}-L_{Met}-D_{Ala})_B$ = même signification mais à partir de la L-Méthionine et de la D-Alanine.

.../...

$(L_{Met}-L_{Met}-L_{Ala})_A$ = tripeptide activé NPS-Met-Met-Ala-ONp
synthétisé par la méthode A à partir des
acides aminés L.

Avec l'aide d'un éluant mixte constitué d'un mélange d'éther
éthylrique et d'acide acétique de composition 20-0,2 (v/v) nous
avons constaté par chromatographie sur couche mince de silice
(D.C.Plastikfolien Keeselgel F₂₅₄ - MERCK épaisseur 0,2 5 mm)
que les diastéréoisomères indexés B ne présentaient chacun
qu'une seule tache.

$(L_{Met}-L_{Met}-L_{Ala})_B$ = LMet-LMet-LAla $R_f = 0,58$

$(L_{Met}-L_{Met}-D_{Ala})_B$ = LMet-LMet-DAla $R_f = 0,66$

Au contraire, le tripeptide activé préparé par la méthode A
s'est révélé être le mélange des deux diastéréoisomères identi-
fiables grâce à l'étalonnage précédent.

$(L_{Met}-L_{Met}-L_{Ala})_A$ $\begin{cases} \text{LMet-LMet-LAla} \\ \text{LMet-LMet-DAla} \end{cases}$ $R_f = 0,58$
 $R_f = 0,66$

Par la mesure des pouvoirs rotatoires des différents échantil-
lons, nous avons évalué la proportion de diastéréoisomères pré-
sents dans le tripeptide indexé A, après deux recristallisa-
tions dans la butanone. Cette mesure nous a montré que l'inver-
sion de configuration se produisait sur 35% environ des rési-
dus alanyle terminaux, et ce résultat est en accord avec nos
conclusions précédentes.

Le tripeptide activé N-protégé, optiquement pur, indexé B a
été transformé en chlorhydrate par action d'une solution méthá-
nolique d'acide chlorhydrique. Le monomère tripeptidique ainsi
obtenu se présente sous la forme d'aiguilles blanches non hy-
groscopiques qui peuvent être aisément recristallisées dans un
mélange d'acétonitrile et d'acide acétique (100:5 en volumes).

.../...

Au contraire, le réactif partiellement racémisé, préparé par la méthode A est isolé à l'état d'huile analogue au tripeptide que nous avons décrit dans la première partie. Ces constatations semblent montrer que l'origine des difficultés que nous avons alors rencontrées ne se trouve pas seulement dans les réactions secondaires qui peuvent se produire lors de l'élimination du groupe protecteur benzyloxycarbone. Il est vraisemblable que le produit qui est obtenu par la méthode A est en fait un mélange de diastéréoisomères qui ne syncristallisent pas ou qu'il contient des impuretés formées au cours des réactions de saponification et d'activation.

III.1.2. Conditions de polycondensation. Séparation des fractions.

Nous avons provoqué la polycondensation du chlorhydrate⁺ HCl, H-LMet-LMet-LAla-ONp obtenu par la méthode B en ajoutant une quantité calculée de triéthylamine dans une solution de ce réactif dans le chloroforme.



Les risques de cyclisation étant moindres dans le cas du tripeptide, nous avons opéré à une concentration plus faible, de l'ordre d'une mmole par ml.

Très rapidement on observe la formation d'un gel qui précède la prise en masse du milieu réactionnel. Après 72 heures de réaction à température ambiante, on dilue par addition de quelques millilitres de chloroforme et on évapore ensuite le solvant sous pression réduite. Le résidu est lavé successivement dans l'alcool, l'eau, de nouveau l'alcool et dans l'éther éthylique, puis séché sous vide à 80°C. On isole ainsi, avec un rendement de 100 %, un polypeptide qui se présente sous la forme d'une poudre blanchâtre dont le point de fusion est supérieur à 350°C.

.../...

De ce produit, on peut extraire par contact prolongé (4 heures) avec du chloroforme, une fraction soluble qui représente 45 à 50% du polymère brut. Par addition d'éther de pétrole, on reprécipite un solide fibreux blanc. Le résidu insoluble peut être dissous dans les acides forts.

III.1.3. - Etude physicochimique du polycondensat

Fraction insoluble .

La fraction insoluble qui ne présente qu'un intérêt limité a été rapidement caractérisée.

A 25°C, sa viscosité intrinsèque dans l'acide dichloracétique est égale à 20 ml.g⁻¹. Son taux d'hélicité déterminé dans ce même acide par application de l'équation de W.MOFFITT-J.T.YANG est de 17% ($b_0 = -110$).

L'examen du spectre d'absorption infra-rouge obtenu avec une prise d'essai solide pulvérulente dispersée dans du bromure de potassium montre (tableau VI) qu'il s'agit principalement d'une structure β (amide I à 1625 et 1690 cm⁻¹)

	Amide, A et B	Amide I	Amide II
cm ⁻¹	3280 et 3060	1690) et) 1655) 1625	1540 - 1510 bande large

Tableau VI - Bandes d'absorption infra-rouge de la fraction insoluble du polytripeptide (dispersé dans KBr)

Fraction soluble

L'étude physicochimique de la fraction soluble présente d'assez grandes difficultés expérimentales. Celles-ci sont dues à la forte agrégation de ce polypeptide lorsqu'il est dissous dans le chloroforme, ce qui interdit toute mesure tonométrique dans ce solvant.

.../...

En outre le produit est insoluble dans l'hexaméthylphosphorotriamide ,ce qui nous a empêché de reproduire sur ce composé les expériences de sédimentation que nous avons faites avec le polydipeptide.

Des essais effectués dans le métacrésol se sont avérés infructueux à cause de la viscosité de ce solvant.

Ce sont finalement les résultats viscosimétriques qui nous ont paru les plus reproductibles et les plus dignes de confiance. Après avoir comparé les valeurs des viscosités intrinsèques trouvées avec le polytripeptide à celles qui caractérisent des fractions de polyméthionine (⁴¹) ou de polydipeptide de poids moléculaires connus, nous pouvons estimer la masse moléculaire moyenne en poids de la fraction soluble du polytripeptide à une valeur voisine de 25 000.

Des renseignements sur la structure secondaire ont été obtenus en examinant la solution elle-même ou un échantillon solide isolé par précipitation.

- Structure à l'état solide.

Spectrométrie infra-rouge:

Le spectre de vibration d'un échantillon examiné sous la forme d'un film permet de conclure à une structure α -hélicoïdale (figure 12 et tableau VII).

	Amide A et B	Amide I	Amide II
cm ⁻¹	3280 et 3050	1652	1542 1515:épaulement

Tableau VII: Bandes d'absorption infra-rouge de la fraction soluble du polytripeptide (film sur KBr)

.../...

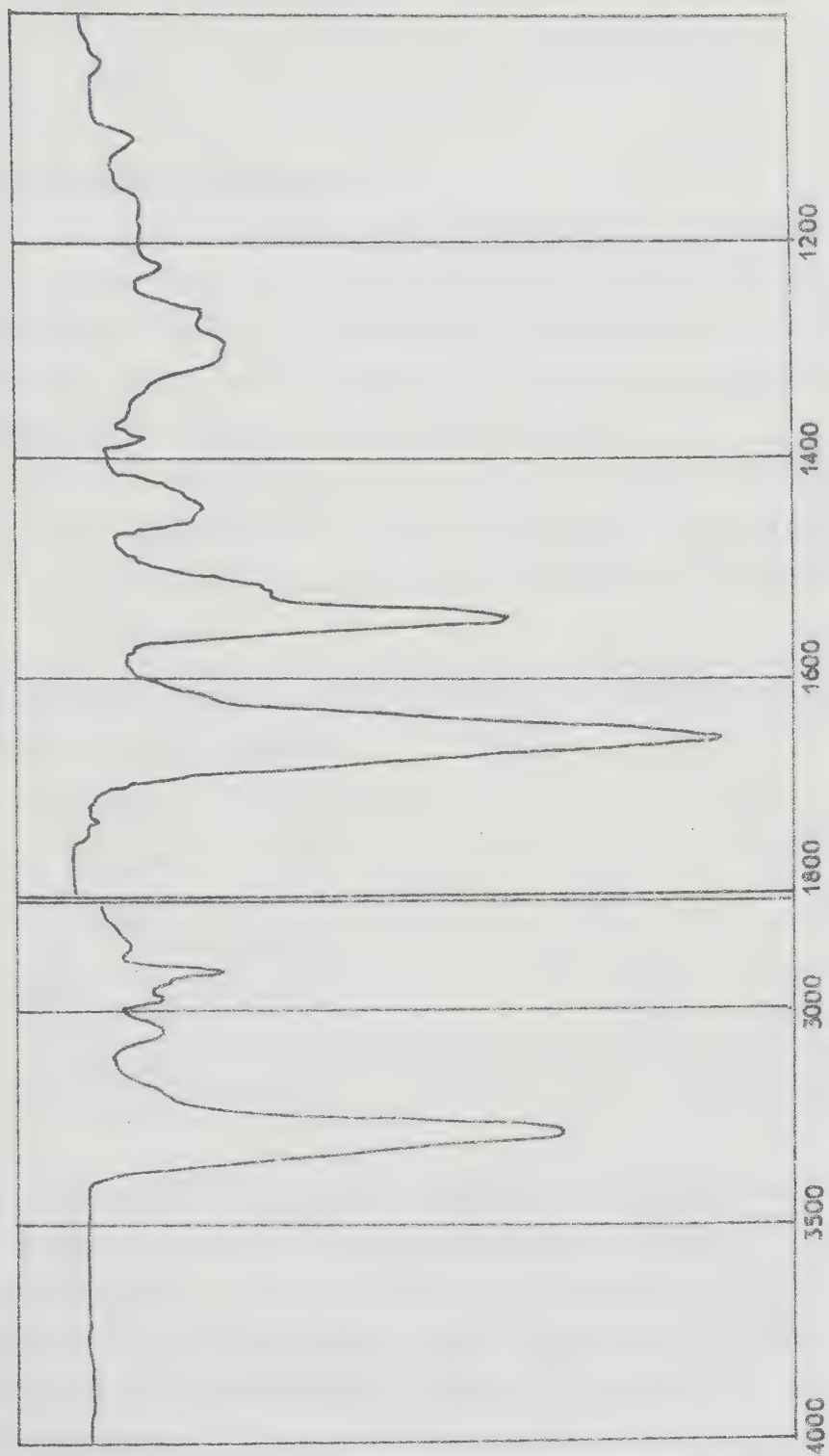


Fig.12 - Spectre d'absorption infra-rouge d'un film du polytripeptide
 $\text{H}-(\text{Met-Pet-Ala})_n-\text{OH}$

Dans certains cas, nous avons pu observer nettement la bande amide V à 612 cm^{-1} , qui est bien caractéristique de la conformation en hélice puisque la même absorption amide V se situe à 650 cm^{-1} dans le cas d'un polypeptide en pelote statistique (⁴²).

Radiocristallographie *:

La bonne régularité structurale du produit que nous avons synthétisé nous a permis de l'obtenir sous une forme très cristalline. Avec un échantillon préalablement étiré en microfibrilles, nous avons obtenu un cliché de diffraction contenant de nombreuses taches (voir Annexe II).

La distribution des taches équatoriales rend compte d'une maille hexagonale caractérisée par les paramètres:

$$\begin{aligned} a &= 10,76 \overset{\circ}{\text{\AA}} \pm 0,01 \overset{\circ}{\text{\AA}} \text{ (3 réflexions équatoriales)} \\ c &= 27,2 \overset{\circ}{\text{\AA}} \end{aligned}$$

On identifie alors sur le diagramme, des interférences correspondant aux espacements:

$$\begin{aligned} d_{0.0.6} &= 4,54 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{0.0.18} &= 1,5 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{1.0.2} &= 7,72 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{1.0.3} &= 6,52 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{1.0.4} &= 5,50 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{1.0.5} &= 4,70 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ d_{1.1.5} &= 3,82 \overset{\circ}{\text{\AA}} \end{aligned}$$

Comme cela avait été antérieurement remarqué dans le cas de la poly L-méthionine (⁴³), on donne une réflexion correspondant aux indices 006. L'explication qui avait déjà été avancée en envisageant la répétition d'une séquence de trois résidus de conformations différentes, demeure à fortiori, valable pour le polytripeptide.

.../...

* L'étude radiocristallographique a été faite en collaboration avec F.COLONNA-CESARI du Laboratoire de Biophysique de l'Université de NANCY (Pr. P.HORN)

- Structure en solution

Dispersion rotatoire optique:

L'étude de la dispersion rotatoire a été effectuée à 24°C en utilisant des mélanges de composition variable de chloroforme et d'acide dichloracétique ou d'acides dichloracétique et trifluoroacétique. Les observations que nous avons faites entre 300 et 450 mμ nous ont permis d'obtenir les valeurs des paramètres précédemment définis, b_0 et H_M (en utilisant l'équation de W. MOFFITT et J. T. YANG) puis A_1, A_2, B et $H_{S.B.}$ (par la relation de E. SHECHTER et E. R. BLOUT⁽³⁰⁾).

Les résultats qui sont rassemblés sur le tableau VIII et sur les figures 13 et 14 montrent que le copolypeptide garde une conformation α-hélicoïdale dans les milieux riches en chloroforme, ce qui est confirmé par l'examen du spectre infra-rouge de ces solutions entre 1600 et 1750 cm⁻¹.

On remarque en outre que b_0 garde une valeur absolue élevée dans l'acide dichloracétique, ce qui prouve la stabilité assez exceptionnelle ⁽⁴⁴⁾ de cette structure en hélice. L'hélicité ne diminue rapidement qu'en présence d'acide trifluoroacétique.

Grâce à sa grande transparence dans l'ultraviolet lointain, l'hexafluoroisopropanol, qui est un solvant notre copolymère permet d'en étudier la dispersion rotatoire anormale. Nous avons observé un maximum d'effet COTTON négatif à 232 mμ qui correspond à la transition $n_0 \longrightarrow \pi^*$ du chromophore amide, laquelle est associée à une absorption située à 222 mμ. L'amplitude de ce maximum est lié au taux d'hélicité H_Y par la formule ⁽⁴⁵⁾

$$H_Y = \frac{-\left([R']_{232} + 2000\right)}{13\ 000}$$

Le pouvoir rotatoire $[R']_{232}$ étant égal à - 13000, on déduit:

$$H_Y = 84 \%$$

.../...

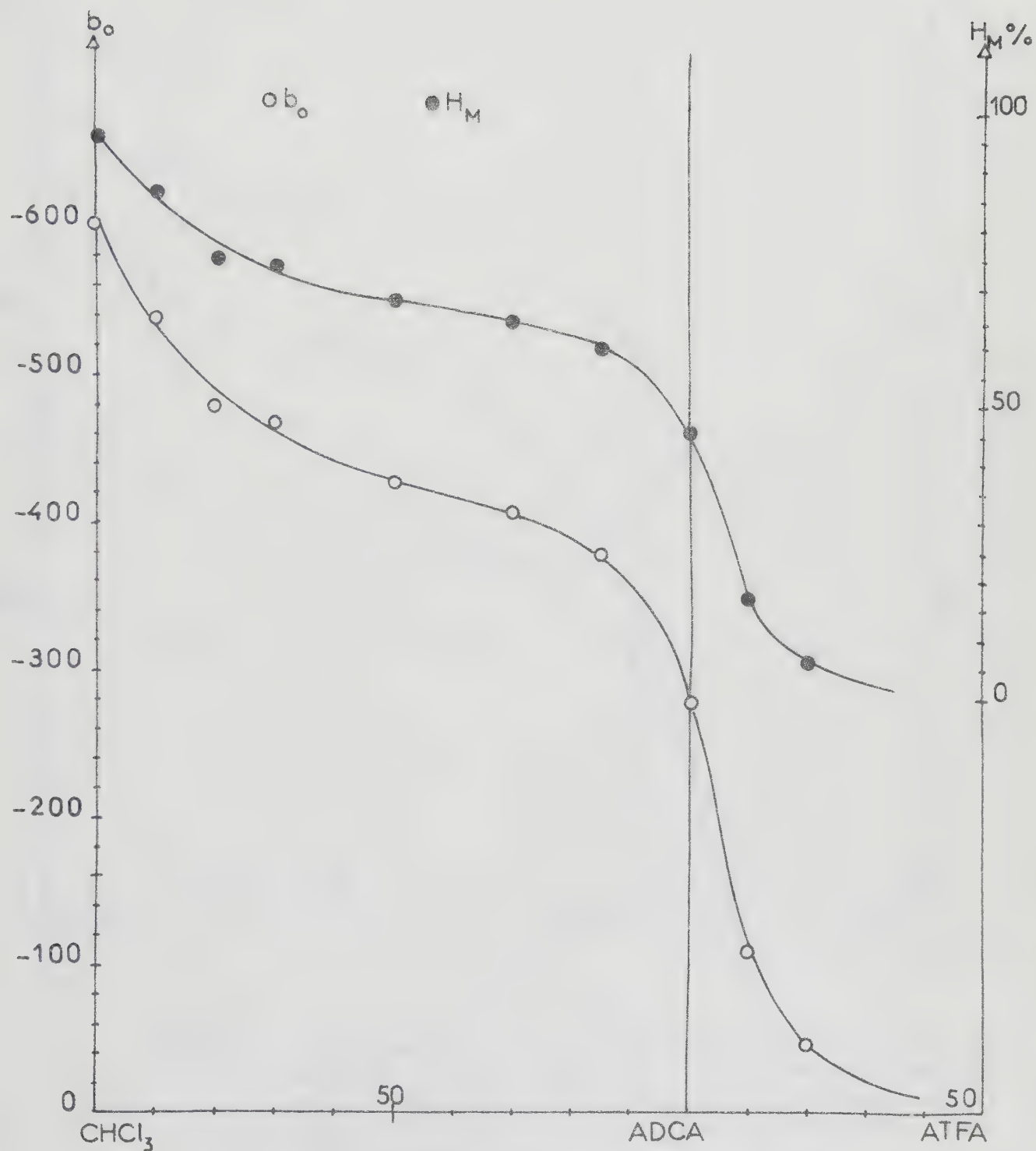


Fig.13 - Polytripeptide $\text{H}-(\text{Met-Met-Ala})_n-\text{OH}$: Variation des paramètres de W.MOFFITT en fonction de la composition des mélanges chloroforme-acide dichloracétique et acides dichloracétique-trifluoroacétique.

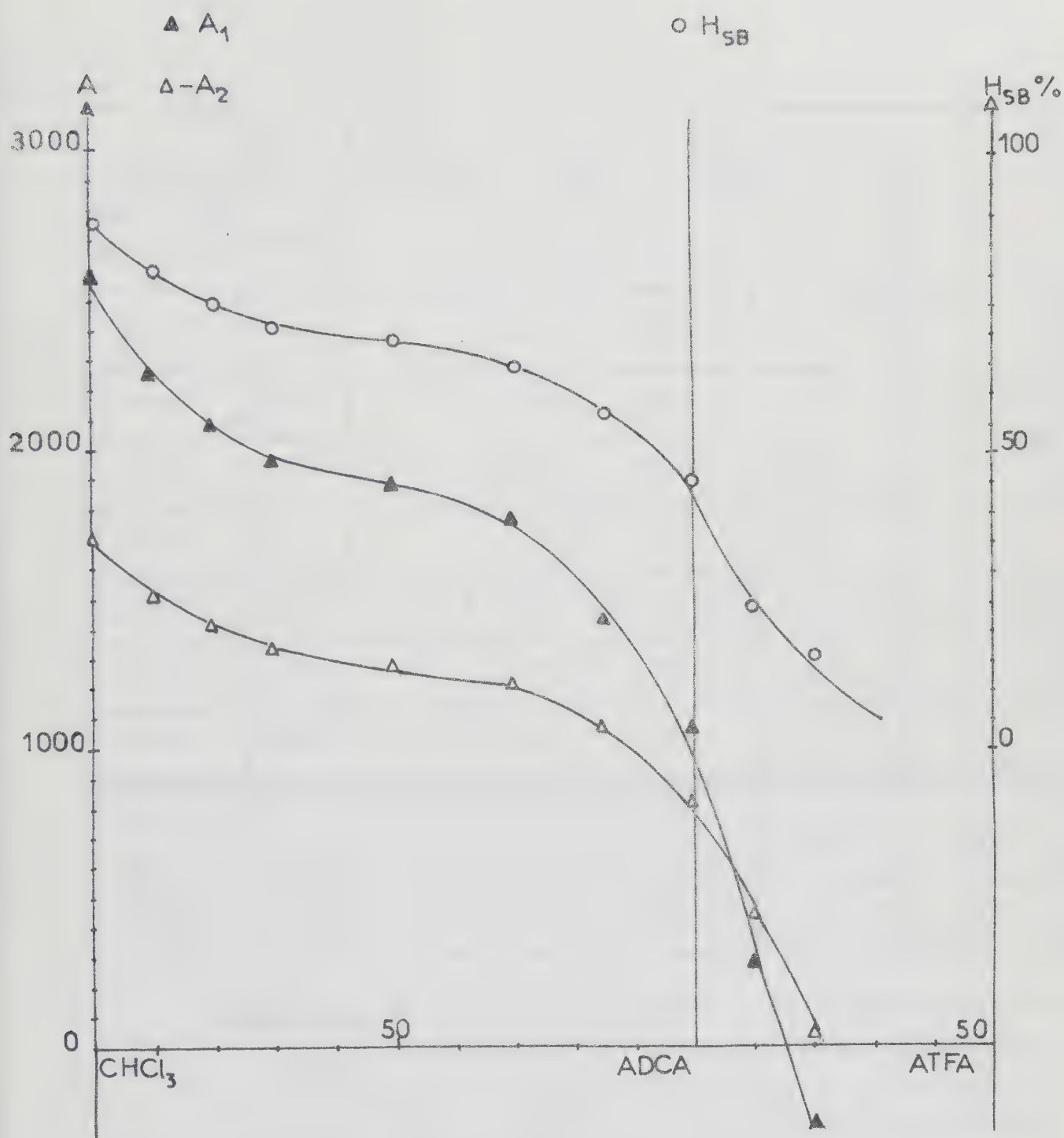


Fig.14 - Polytripeptide H-(Met-Met-Ala)_n-OH: Variation des paramètres de E.SHECHTER et E.R.BLOUT, en fonction de la composition des mélanges chloroforme-acide dichloracétique et acides dichloracétique - trifluoroacétique.

	b_o	$H_M \%$	A_1	A_2	$H_{SB} \%$	B
CHCl ₃ -ADCA 100 - 0	-600	95	2580	-1700	88	281
90-10	-540	86	2270	-1510	80	260
80-20	-480	75	2090	-1415	75	272
70-30	-470	74	1970	-1340	71	260
50-50	-430	68	1895	-1285	69	243
30-70	-410	65	1780	-1215	65	236
15-85	-380	60	1450	-1080	57	280
0-100	-290	46	1065	- 830	46	245
ADCA-ATFA 90-10	-110	17,5	275	- 445	24,5	293
80-20	- 45	7	260	- 25	16	276

Tableau VIII: Différents paramètres de Dispersion rotatoire optique calculés pour des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable et pour deux mélanges acide dichloracétique-acide trifluoroacétique.

.../...

Cette valeur s'accorde parfaitement avec celle qui résulte de la mesure de b_0 effectuée sur une solution du polytripeptide dans ce solvant. En effet b_0 est égal à -500 ce qui correspond à un taux d'hélicité de 80% (si l'on s'en réfère à la poly L-méthionine qui, dans les mêmes conditions est parfaitement hélicoïdale (⁴¹) et est caractérisée par un paramètre b_0 voisin de -630).

Il apparaît donc que l'hexafluoroisopropanol qui est ordinairement classé parmi les solvants hélicogènes(⁴⁶) perturbe toutefois légèrement la structure hélicoïdale adoptée par le polytripeptide que nous examinons.

Viscosité :

Dans les mêmes milieux, la viscosité intrinsèque du produit étudié varie comme il est indiqué sur le tableau IX et la figure 15.

Les valeurs très élevées et assez peu reproductibles trouvées lorsque l'on opère dans le chloroforme pur montrent qu'il y a formation d'agrégats.

L'addition d'acide dichloracétique permet de les dissocier progressivement et l'introduction d'acide trifluoroacétique provoque la transition hélice-pelote. Ces deux évolutions n'étant pas nettement séparées l'interprétation de la courbe de viscosité est cependant moins simple que celle qui concerne les variations des paramètres de dispersion rotatoire.

Composition CHCl ₃ -ADCA	100-0	95-5	90-10	80-20	70-30	50-50	30-70
$[\eta]_{\text{ml.g}^{-1}}$	310	117	113	97	94	86	77
Composition ADCA-ATFA	100-0	90-10	80-20				
$[\eta]_{\text{ml.g}^{-1}}$	69	57	54				

Tableau IX: Indices de viscosité du polytripeptide mesurés à 25°C pour des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable et deux mélanges acide dichloracétique - acide trifluoroacétique.

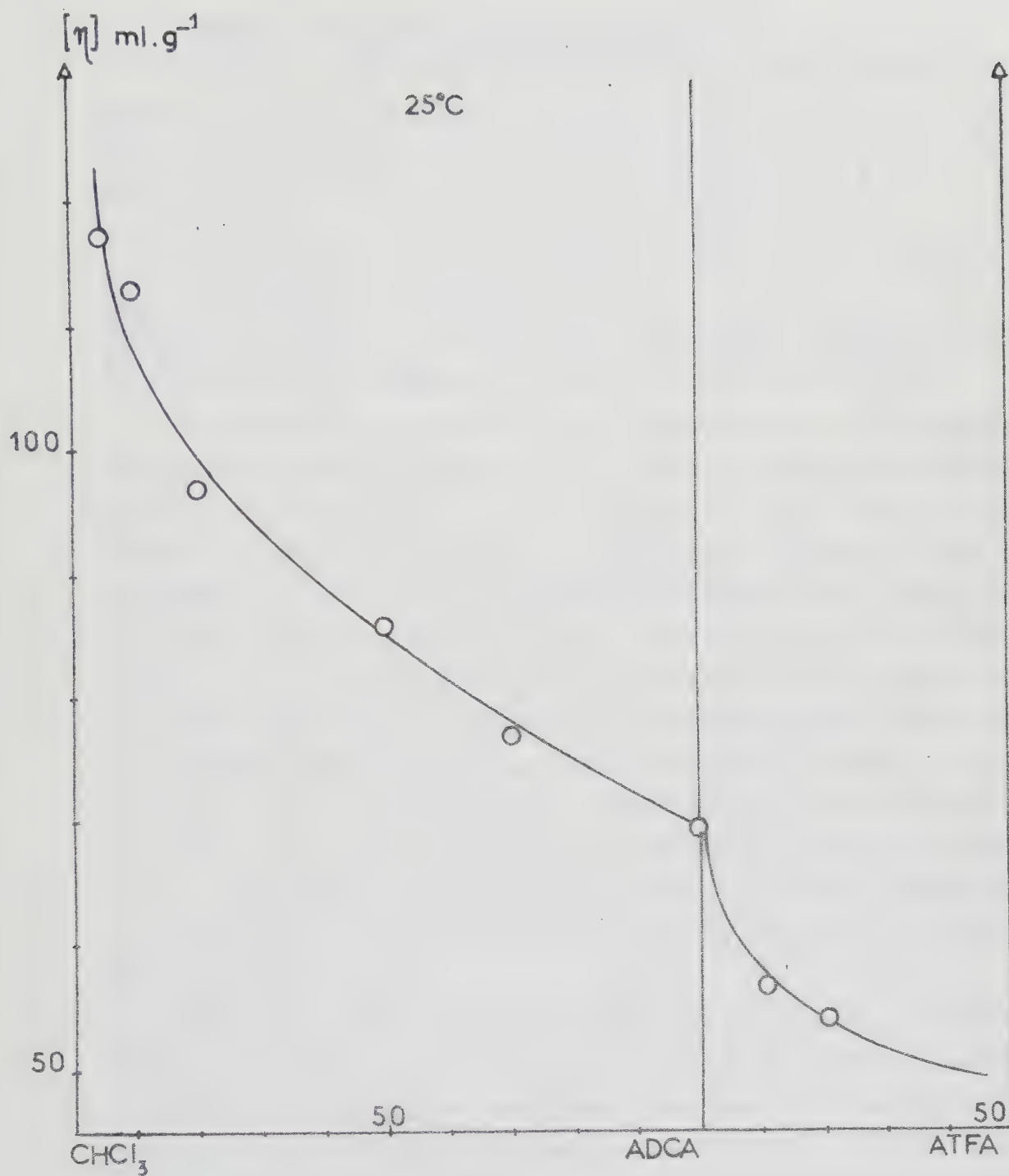


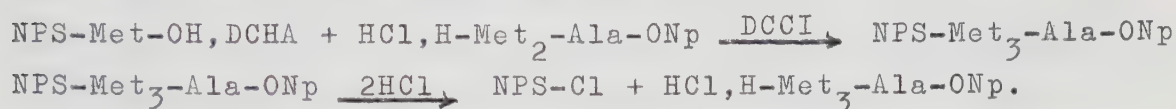
Fig. 15 - Variation de la viscosité intrinsèque du poly (Met-Met-Ala) en fonction de la composition des mélanges chloroforme-acide dichloracétique et acides dichloracétique-trifluoroacétique.

III.2 - PREPARATION ET CARACTERISATION DU POLYTETRAPEPTIDE (Met₃-Ala)_n .

III.2.1. Synthèse du tétrapeptide:

Nous avons cherché à généraliser notre procédé de synthèse à des séquences plus longues et nous avons, en particulier, tenté de préparer le polytétrapeptide (Met₃-Ala)_n à partir du monomère activé HCl, HMet₃-Ala-ONp .

Pour obtenir ce dernier, il suffit en principe, d'effectuer les deux réactions supplémentaires.



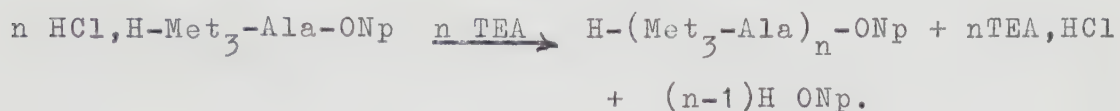
Pendant la première de ces transformations, le risque d'aminolyse intramoléculaire de l'ester activé est moindre que lors de la condensation sur un dipeptide qui se cyclise facilement en dicétopipérazine. La principale difficulté que l'on rencontre est due à l'insolubilité croissante des produits formés qui oblige à opérer dans des solutions de plus en plus diluées. Il y a donc des conditions optimales à trouver et, après les avoir déterminées (voir Partie Expérimentale), nous avons pu effectivement synthétiser le tétrapeptide NPS-Met₃-Ala-ONp avec un rendement satisfaisant. Toutefois, la purification de ce produit est assez malaisée; en effet, la dicyclohexylurée et le chlorhydrate de dicyclohexylamine qu'il est nécessaire d'éliminer ont les mêmes solvants que le réactif que l'on cherche à isoler.

Enfin l'insolubilité du tétrapeptide dans les solutions méthanoliques de gaz chlorhydrique oblige à opérer en présence d'acide acétique. Après addition d'une quantité calculée de méthanol saturé d'acide chlorhydrique (10 N), le chlorhydrate se forme en quelques minutes et il peut être précipité par l'éther anhydre. On l'obtient ainsi sous forme d'aiguilles blanches qui sont finalement recristallisées dans un mélange d'acétonitrile et d'acide acétique (100:25 en volumes).

.../...

III.2.2.-Polycondensation et caractérisation du polycondensat.

La polycondensation est effectuée comme dans les cas précédents, en libérant la fonction amine de l'oligopeptide par de la triéthylamine, en milieu chloroformique (2 mM dans 3 ml).



Après trois jours, le polycondensat brut est isolé, lavé et séché dans les mêmes conditions que les autres copolypeptides. On obtient ainsi avec un rendement de 100 % environ, une poudre blanchâtre dont le point de fusion est supérieur à 350°C.

Par extraction prolongée avec du chloroforme (4 heures) on isole une fraction soluble représentant à peu près 30% du polymère brut.

Caractérisation rapide des deux fractions -

Spectres infra-rouge . Ainsi qu'il apparaît sur le tableau X la partie insoluble présente les caractéristiques d'une structure β antiparallèle, alors que la partie soluble se trouve sous forme α -hélicoïdale (cf. figure 16).

	Amide A et B cm ⁻¹	Amide I cm ⁻¹	Amide II cm ⁻¹
Fraction insoluble	3280 et 3070	1690 et 1622 1652:épaulement	1545 1510:épaulement
Fraction soluble	3280 et 3040	1652	1540 1515:épaulement

Tableau X : Bandes d'absorption infra-rouge des fractions insoluble et soluble du polytétrapeptide.

.../...

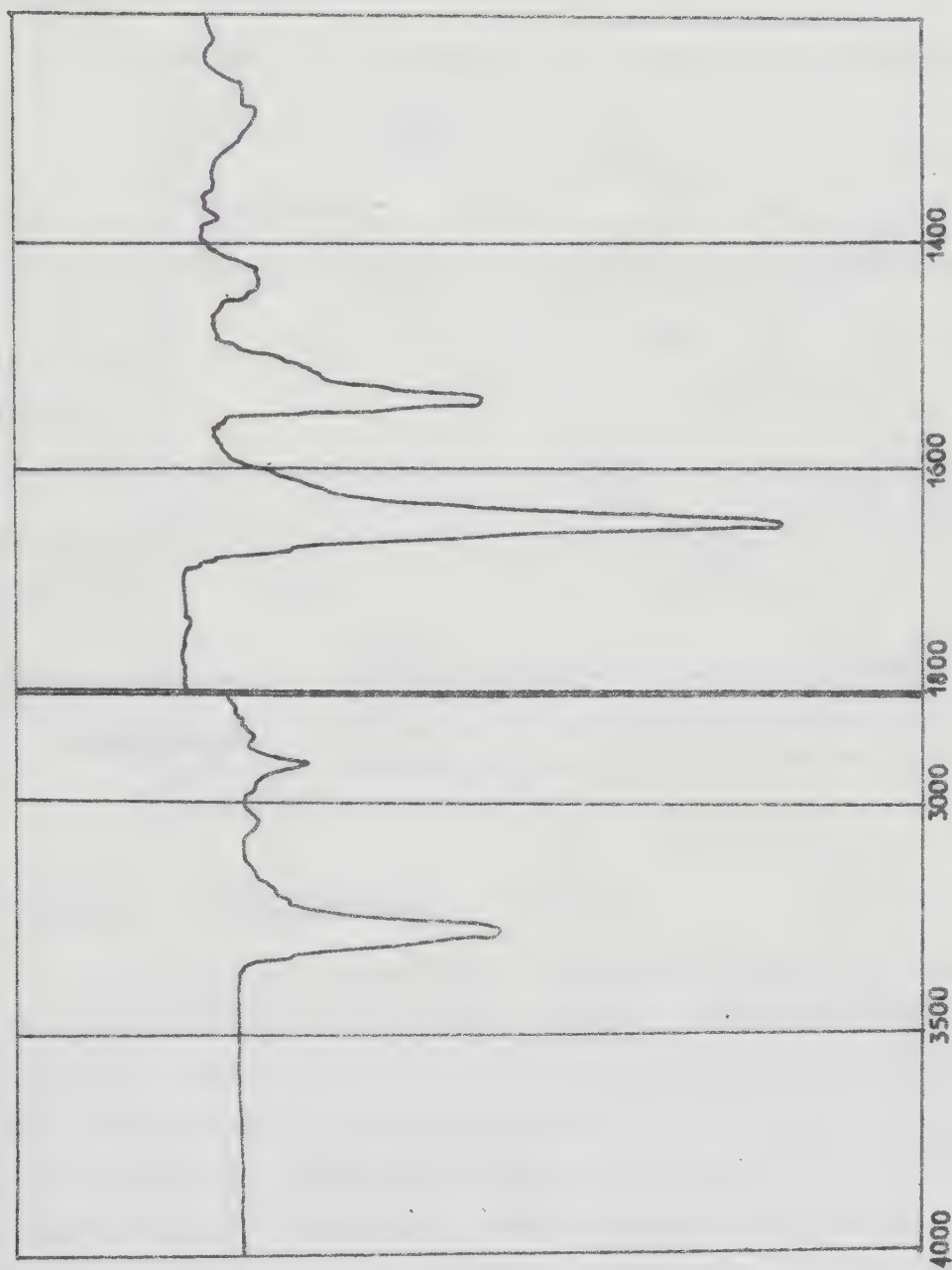


Fig.16 - Spectre d'absorption infra-rouge d'un film du polytétrapeptide
 $\text{H}-(\text{Met-Met-Met-Ala})_n-\text{OH}$

Viscosité et dispersion rotatoire optique:

Les différentes mesures ont été effectuées, pour les deux fractions, soit dans le chloroforme quand c'était possible, soit dans l'acide dichloracétique. Elles sont reportées dans le tableau XI.

	$[\eta]_{\text{ml.g}^{-1}}$ CHCl ₃ -ADCA 95 - 5	$[\eta]_{\text{ml.g}^{-1}}$ ADCA	b_0 CHCl ₃ $H_M \%$	b_0 ADCA $H_M \%$
fraction soluble	44	25	- 500 80 %	- 250 40 %
fraction insoluble		10		- 50 8 %

Tableau XI: Indices de viscosité et paramètres de dispersion rotatoire des fractions soluble et insoluble du poly(Met₃-Ala)

III.2.3 - Conclusions

Les quelques résultats rassemblés dans les tableaux X et XI nous conduisent à penser que le polytétrapeptide que nous avons observé n'a pas un très haut poids moléculaire. En effet, la viscosité intrinsèque de la fraction soluble mesurée dans un mélange chloroforme-acide dichloracétique (95:5) n'est que de 44 ml.g⁻¹. Dans les mêmes conditions, la valeur qui caractérisait les copolypeptides précédemment décrits était supérieure à 100 ml.g⁻¹.

Cependant le spectre infra-rouge de la fraction soluble effectué sur une solution chloroformique identique à celui

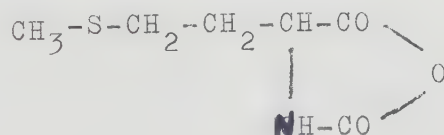
.../...

fait sur un film, et la mesure de b_0 , nous permettent de supposer que la structure est, pour la plus grande partie, α -hélicoïdale. On peut néanmoins estimer que dans cette fraction soluble se trouve un certain nombre de molécules désordonnées qui abaissent la valeur de b_0 à -500. En outre, le pourcentage d'hélicité H_M calculé pour une solution dans l'acide dichloracétique, montre que, comme pour les copolypeptides précédents, la structure α -hélicoïdale est encore relativement stable dans ce solvant actif.

Quant à la partie insoluble, la valeur très faible de b_0 dans l'acide dichloracétique prouve que les petites macromolécules ($[\eta] = 10 \text{ ml.g}^{-1}$ acide dichloracétique) qui la constituent sont probablement sous forme désordonnée.

III-3. COMPARAISON DES COPOLYPEPTIDES ORDONNES RICHES EN METHIONINE, AVEC LA POLY L-METHIONINE.

Les propriétés physico-chimiques de la poly L-Méthionine préparée dans notre laboratoire (⁴¹) par polycondensation de l'anhydride de Leuchs:



ont également été étudiées par spectroscopie infra-rouge, dispersion rotatoire optique, viscosimétrie et diffraction aux rayons X.

Sans entrer dans les détails, nous remarquerons seulement que le comportement tant à l'état solide, qu'en solution, de cet homopolypeptide est tout à fait comparable à celui des fractions solubles dans le chloroforme des copolymères ordonnés; En ce qui concerne les spectres infra-rouge, ils sont identiques en solution chloroformique et à l'état solide.

.../...

Les mesures de dispersion rotatoire optique mettent en évidence une structure α -hélicoïdale stable vis-à-vis de l'acide dichloracétique, que ce soit pour la poly L-Méthionine ou pour les copolypeptides ordonnés. Cette propriété était d'ailleurs prévisible pour les poly tri- et tétrapeptide, constitués en majorité par la méthionine. Pour le polydipeptide également, sachant que la poly L-Alanine possède une conformation α -hélicoïdale, très stable même vis-à-vis de l'acide trifluoroacétique (⁴⁷), on pouvait s'attendre à lui trouver cette même caractéristique.

Enfin, en ce qui concerne la diffraction des rayons X, la tache située à 006, qui avait été mise en évidence sur le cliché de la poly L-Méthionine (⁴³) a également été observée sur le diagramme du polytripeptide. Au contraire, elle est absente dans le cas du polydipeptide ce qui confirme bien l'opinion émise antérieurement selon laquelle cette réflexion serait due à l'existence le long de l'enchaînement polypeptidique, d'une périodicité mettant en cause trois résidus successifs.

QUATRIEME PARTIE

IMPORTANCE COMPAREE DE LA PURETE CHIMIQUE ET DE LA PURETE STERIQUE DES AMINO-ESTERS ACTIVES UTILISES DANS LA SYNTHESE DES COPOLYPEPTIDES ORDONNES.

On peut classer les différents copolypeptides précédemment décrits en deux catégories qui les distinguent par leurs propriétés physicochimiques:

- la première groupe les produits qui sont peu polycondensés et insolubles dans le chloroforme.
- la seconde rassemble les polycondensats qui présentent une viscosité élevée, qui se dissolvent facilement dans ce solvant chloré et qui sont, de ce fait probablement stéréoréguliers.

En fait, on a montré, dans ce qui précède, que ces propriétés dépendent de la méthode utilisée pour préparer le monomère; en effet les oligopeptides activés synthétisés par la méthode B (figure 4) non racémisante, fournissent des polymères hautement polycondensés, contrairement à ceux que l'on obtient par le procédé A (figure 5 b) où l'on forme intermédiairement un ester méthylique dont la réactivation provoque une inversion partielle de configuration optique du résidu C-terminal.

Nous n'avons cependant pas résolu le problème de savoir si cette différence était due au manque de pureté stéréochimique

du monomère préparé par la voie A, ou à la présence d'impuretés dans ce produit.

Dans cette IVème Partie, nous décrirons les expériences que nous avons effectuées en vue de déterminer les rôles respectifs de la pureté optique et de la pureté chimique du monomère sur les propriétés du polycondensat, et nous dirons quelques mots de la façon dont nous avons tenté d'évaluer les risques de racémisation susceptibles d'intervenir au cours de la polycondensation.

IV. 1 -[^]ROLE DE LA PURETE OPTIQUE DU MONOMERE.

Afin de préciser dans quelle mesure un défaut de pureté stéréochimique des monomères préparés par la méthode A pouvait être tenu pour responsable de la faible solubilité et du bas poids moléculaire des polypeptides correspondants, nous avons polycondensé* un mélange artificiel, contenant respectivement 70% et 30% des deux dipeptides diastéréoisomères HCl, H-LMet-LAla-ONp et HCl, H-LMet-DAla-ONp. Cette composition a été choisie voisine de celle que nous avons reconnue dans le produit synthétisé par le procédé A.

IV.1.1.-Préparation du "monomère" et polycondensation.

Chacun des deux diastéréoisomères L-L et L-D C-activés a été préparé par la méthode B et est donc optiquement pur (voir figure 5a - Partie II.2.2.)

Le mélange 70% L-L + 30% L-D est obtenu en malaxant soigneusement les deux dipeptides - on est donc certain de la pureté chimique du "monomère" ainsi préparé - et il est polycondensé dans les mêmes conditions que le dipeptide L-L (voir Partie II.3).

.../...

* Travail mené en collaboration avec P.HUBERT.Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire. E.N.S.I.C.,NANCY.

Après trois jours, on isole le polycondensat de la même façon que pour les autres copolypeptides et la fraction soluble dans le chloroforme représente environ 20% du rendement théorique. Cette partie est précipitée par addition d'éther de pétrole.

IV.1.2.-Etude physicochimique de la fraction soluble.

- Spectre infra-rouge:

Observation faite sur un film obtenu par évaporation d'une solution chloroformique sur un disque de bromure de potassium.

Les principales bandes d'absorption qui figurent sur le schéma 17 et qui sont reportées sur le tableau XII, nous permettent de supposer que cette fraction adopte elle aussi la

	Amide A et B	Amide I	Amide II
cm ⁻¹	3280 et 3040	1652	1545 1516:épaule- ment

Tableau XII: Bandes d'absorption infra-rouge de la fraction soluble dans le chloroforme du polydipeptide
 $\text{H}-(\text{Met-Ala})_n-\text{OH}(\text{L-L,D})_n$.(film sur KBr)

conformation α -hélicoïdale à l'état solide.

- dispersion rotatoire optique:

L'étude a été menée comme précédemment en opérant dans des mélanges chloroforme-acide dichloracétique de composition variable . Nous avons rassemblé les différentes valeurs de b_o, H_M et $A_1, A_2, H_{S.B.}, B$ précédemment définies, sur le tableau XIII et les figures 18 et 19.

.../...

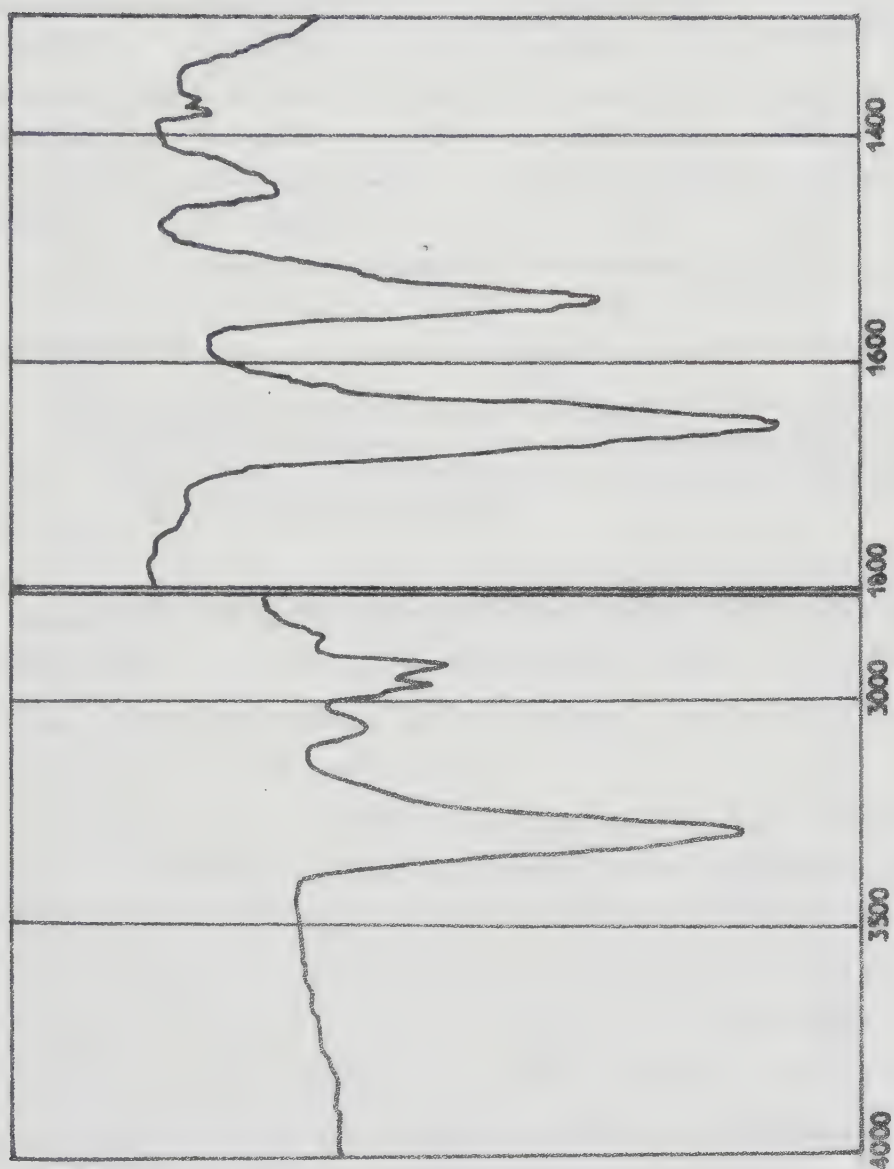


Fig.17 - Spectre d'absorption infra-rouge d'un film
du polydipeptide $-(L-L,D)_n-$

Composition CHCl ₃ -ADCA	b ₀	H _M %	A ₁	A ₂	H _{SB} %	B
100-0	-530	84	2465	-1500	83	144
80-20	-505	71	2235	-1360	76	133
50-50	-410	65	1930	-1185	67	123
20-80	-245	39	1127	- 747	45	127
0-100	- 95	15	169	-257	19	164

Tableau XIII: Valeurs des paramètres de dispersion rotatoire optique, calculées pour la fraction soluble du polydipeptide (L-L,D)_n en solution dans des mélanges chloroforme-acide dichloracétique.

La première constatation que l'on peut faire est que, dans le chloroforme pur, le taux d'hélicité n'est pas voisin de 100%, et que, par conséquent, la structure α -hélicoïdale n'est sans doute pas la seule présente.

Par ailleurs les courbes qui représentent la variation de H_M et H_{S.B.} en fonction de la composition du mélange (voir^{les} figures 18 et 19) présentent une allure totalement différente de celles qui caractérisent le polydipeptide (L-L)_n et le polytripeptide (voir les figures 9, 10 et 13, 14). Dans le cas présent en effet, on n'observe pas de transition hélice-pelote nette, mais plutôt une décroissance monotone des différents paramètres au fur et à mesure que l'on ajoute de l'acide dichloracétique, ce qui traduit une déstabilisation progressive de la conformation α -hélicoïdale.

- Mesures viscosimétriques.

L'examen du tableau XIV et de la figure 20 où sont reportées les valeurs de l'indice de viscosité $[\eta]$ dans divers mélanges chloroforme-acide dichloracétique ne fait que confirmer l'interprétation donnée à la courbe de variation des paramètres

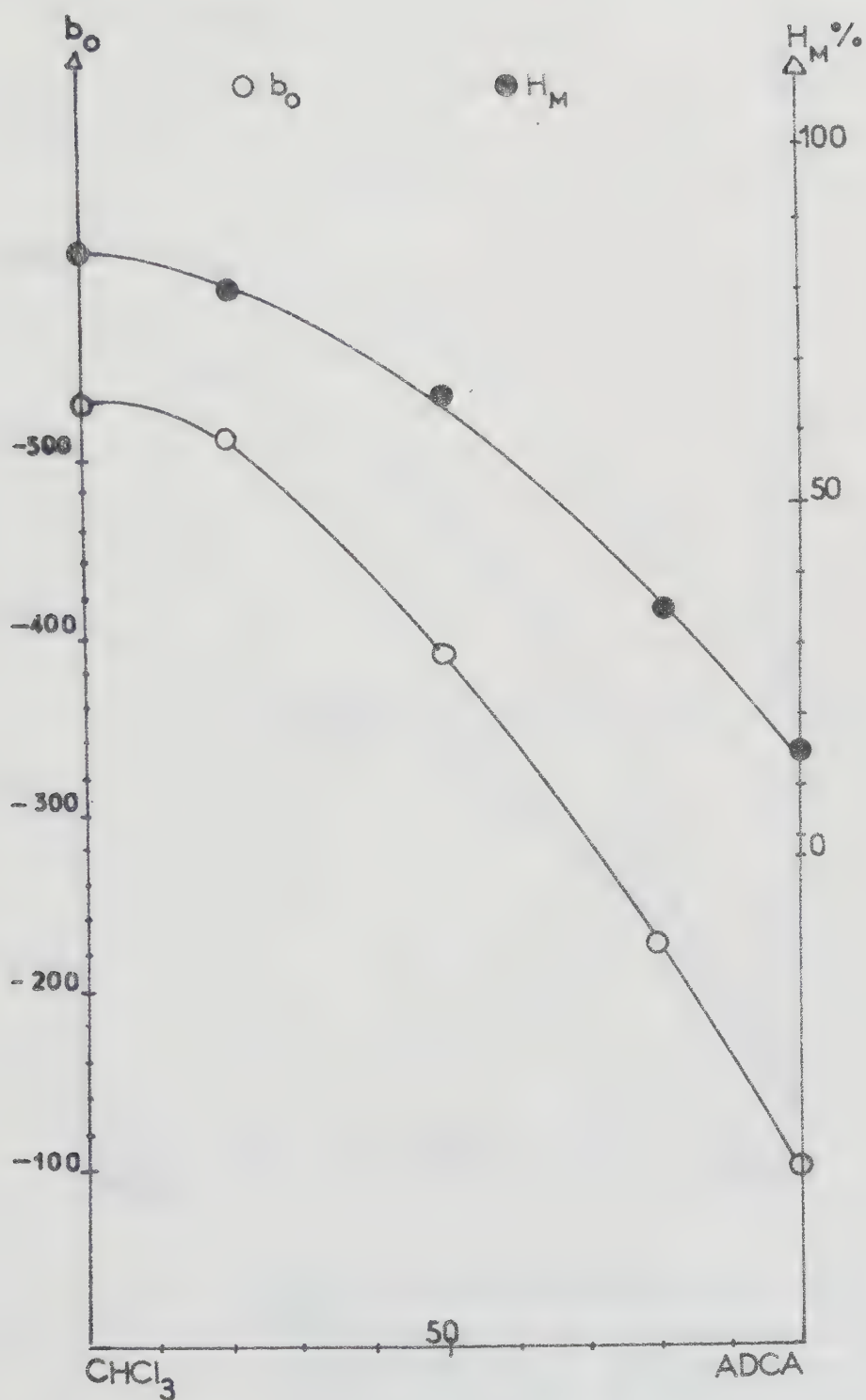


Fig.18 - Polydipeptide (L-L,D)_n : variation

des paramètres de W.MOFFITT en fonction de la composition du mélange chloroforme-acide dichloracétique.

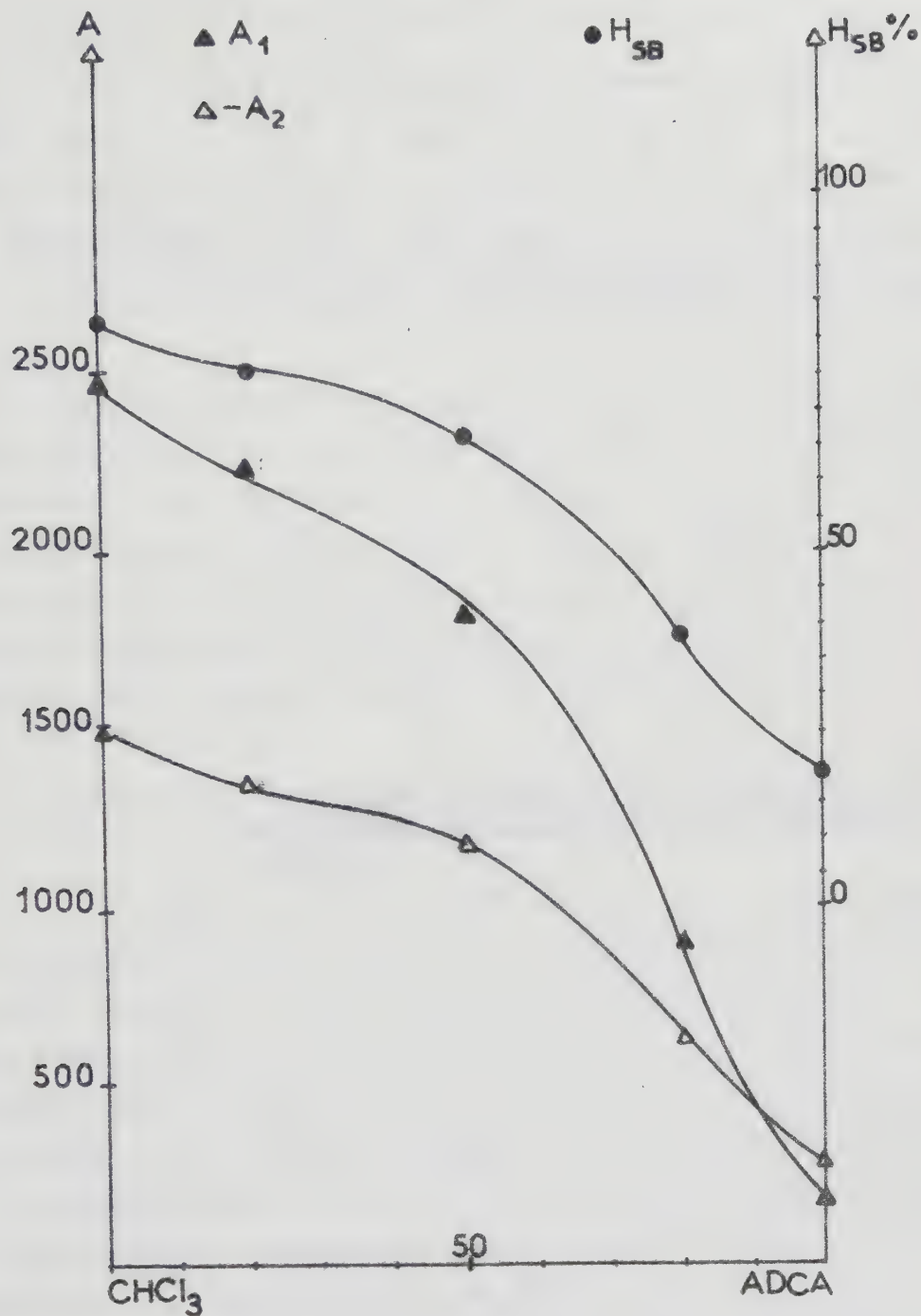


Fig.19 - Polydipeptide(L-L,D)_n: variation des paramètres de E.SHECHTER et E.R.BLOUT en fonction de la composition du mélange chloroforme-acide dichloracétique.

Composition CHCl ₃ -ADCA	90-10	75-25	60-40	50-50	25-75	0-100
$[\eta]$ ml.g ⁻¹	145	143	129	98	78	60

Tableau XIV: Valeurs de l'indice de viscosité, mesuré à 25°C, de la fraction soluble du polydipeptide (L-L,D)_n dans différents mélanges chloroforme-acide dichloracétique.

de dispersion rotatoire optique. Dans ce cas-ci, en outre, il faut noter la présence d'agréats dans le chloroforme qui se manifeste par un indice de viscosité anormalement fort. Ajoutons enfin que les valeurs élevées de $[\eta]$ nous laissent penser que cette fraction est hautement polycondensée et que sa masse moléculaire est probablement de l'ordre de celle du polydipeptide préparé à partir du monomère optiquement pur.

IV.1.3. Conclusions relatives à l'influence de la pureté optique du monomère sur les propriétés du polycondensat.

Jusqu'à présent, nous avons pensé que la présence d'un épimère indésirable dans l'oligopeptide C-activé utilisé comme monomère, pouvait être la cause des propriétés médiocres de certains de nos copolypeptides. L'examen des résultats que nous venons d'exposer semble montrer au contraire que l'influence de la pureté optique n'est pas aussi importante que nous l'avions supposé. En effet en polycondensant un mélange de diastéréoisomères, nous avons obtenu une fraction soluble dans le chloroforme, avec le même rendement que lorsque nous avons polycondensé un dipeptide de stéréochimie L-L. En outre, les copolypeptides synthétisés dans les deux cas - poly (L-L) et poly (L-L,D)- ont des poids moléculaires très voisins.

Par contre on peut penser que la présence d'une petite quantité de diastéréoisomère L-D dans le produit de départ modifie la stabilité de la structure α -hélicoïdale (⁴⁸), vis-à-vis des solvants riches en acide dichloracétique, puisque dans

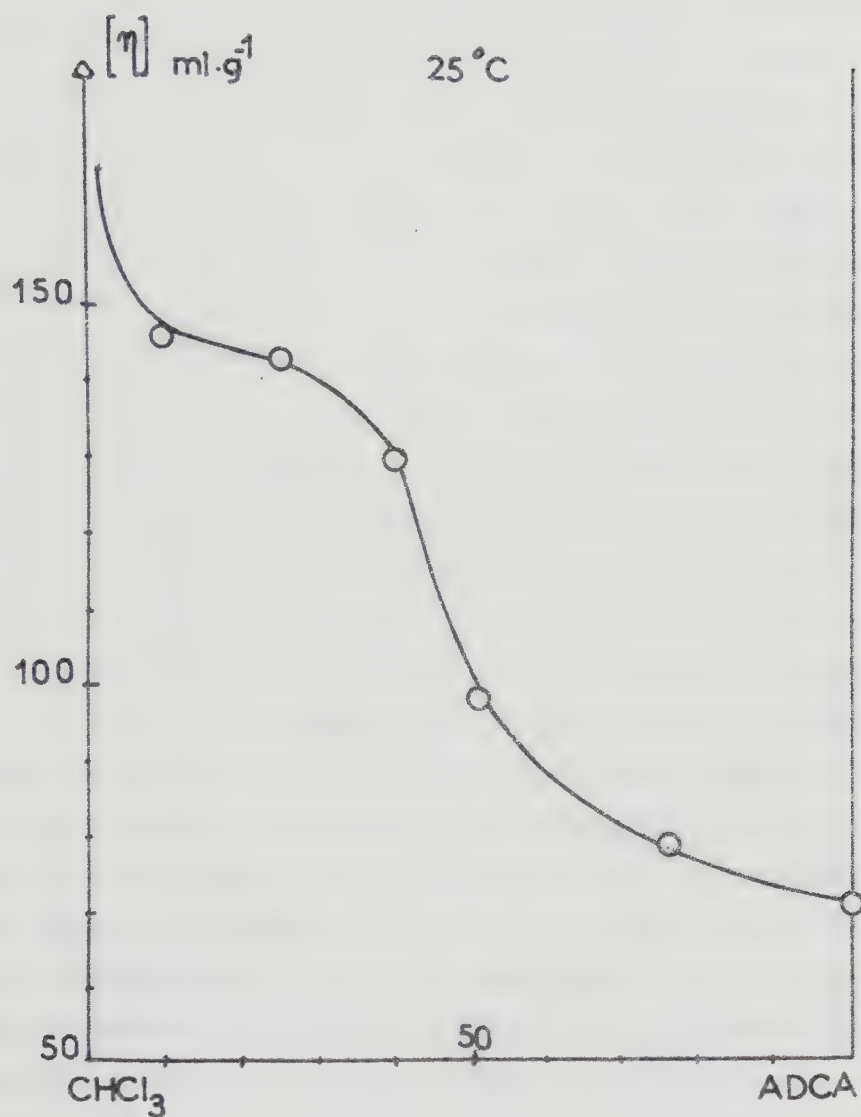


Fig.20 - Variation de la viscosité intrinsèque du polydipeptide (L-L,D)_n en fonction de la composition du mélange chloroforme-acide dichloracétique.

cet acide pur le pourcentage d'hélicité n'est plus que de 15%, alors que pour les copolypeptides préparés à partir des monomères optiquement purs, il reste supérieur à 50%.

En conclusion, on peut donc dire que la pureté stérique des oligopeptides C-activés, utilisés comme monomères n'est pas la caractéristique la plus importante qui détermine les propriétés physico-chimiques (solubilité et masse moléculaire) des copolypeptides auxquels ils donnent naissance. Toutefois, la polycondensation d'un "monomère" constitué par un mélange de diastéréoisomères de dipeptide L-L + L-D, dans les proportions respectives de 70% et 30%, conduit à un polypeptide dont la structure α -hélicoïdale à l'état dissous est beaucoup moins stable vis-à-vis des acides forts, que ne l'était la poly (L-Méthionyl L-Alanine); ceci s'explique sans doute par le fait que certains résidus dipeptidiques L-D se sont introduits dans l'enchaînement polypeptidique principal composé de résidus L-L, rompant ainsi la régularité de l'hélice α , qui peut être, de cette façon, plus facilement détruite. En fait, nous avons effectué une polycondensation statistique de deux résidus dipeptidiques, l'un, le L-L étant hélicogène (c'est-à-dire qu'il donne, lorsqu'il est polycondensé seul, une hélice α), contrairement à l'autre, le L-D qui donne naissance à un polypeptide dont la structure a été étudiée dans notre laboratoire (⁴⁹). Toutefois, dans ce cas-ci, comme le polymère étudié ne représente qu'une petite partie du polycondensat total, le problème qui reste à résoudre est la détermination de la proportion des séquences L-D par rapport aux séquences L-L, existant dans cette fraction. Sans doute, l'utilisation de L-Méthionine possédant un soufre marqué permettrait-elle d'éclaircir ce point.

IV.2 - [^]ROLE DE LA PURETE CHIMIQUE DU MONOMERE.

La série d'expériences que nous venons de décrire, suffirait à elle seule à démontrer que la pureté chimique de l'oligopeptide de départ est en grande partie responsable des faibles masses obtenues pour certains de nos polycondensats.

.../...

Afin de confirmer ces résultats, nous avons préparé un copolypeptide de méthionine et de glycine dans lequel ce dernier résidu, qui ne possède pas de C asymétrique est placé à l'extrémité C-terminale de l'oligopeptide.

IV.2.1.-Préparation du monomère

Nous avons choisi de synthétiser et de polycondenser le tripeptide HCl, H-Met-Met-Gly-ONp. Nous avons, pour ce faire, utilisé la méthode A (voir figure 1) qui consiste à préparer Z-Met-Met-Gly-OMe (tripeptide obtenu de la même façon que Z-Met-Met-Ala-OMe) à saponifier l'ester méthylique et à réestérifier la fonction carboxylique ainsi libérée par le p.nitrophénol en présence de dicyclohexylcarbodiimide. La glycine ne possédant pas de C asymétrique, la racémisation, mise en évidence lors de l'estérification en présence de dicyclohexylcarbodiimide, d'oligopeptides à fonction carboxylique libre, terminés par l'alanine (voir les Parties II.2.2. et III.1.), ne peut pas se produire dans le cas présent.

A partir du tripeptide N-protégé, peu soluble dans les solvants courants et qui par suite contient sans doute un peu de dicyclohexylurée et de p.nitrophénol, le chlorhydrate est obtenu par l'action de l'acide trifluoroacétique, suivie d'une précipitation par l'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique. On remarque que ce produit est aussi hygroscopique et difficilement cristallisable que les chlorhydrates obtenus à partir de Z-Met-Met-Ala-ONp, NPS-Met-Ala-ONp, NPS-Met-Met-Ala-ONp lorsque ces oligopeptides sont préparés par la voie A. Dans le cas présent, nous n'avons pas de diastéréoisomères possibles comme pour les peptides terminés par l'alanine, et le défaut de cristallinité de ce chlorhydrate ne peut donc s'expliquer que par la présence d'impuretés.

IV.2.2. Polycondensation.

Le chlorhydrate du tripeptide terminé par le résidu glycyle est néanmoins recristallisé plusieurs fois dans un mélange

.../...

isopropanol-éther anhydre et il est polycondensé dans le chloroforme à raison de 5 mM dans 4 ml de solvant, en présence d'une quantité stoechiométrique de triéthylamine. Après quatre jours, on reprend par quelques millilitres de chloroforme, et évapore le solvant sous vide; le résidu est alors traité comme les précédents polypeptides et séché sous vide.

On obtient un produit pulvérulent, ocré, avec un rendement de 70%.

Ce polycondensat est insoluble dans les solvants usuels et en particulier dans le chloroforme, et ne se dissout aisément que dans les acides forts.

IV.2.3. Propriétés physicochimiques du polycondensat.

Les expériences précédentes ayant montré que l'insolubilité dans le chloroforme était en rapport avec un faible degré de polycondensation, confirmation nous fut donnée par quelques mesures rapides.

- L'indice de viscosité mesuré à 25°C pour une solution dans l'acide dichloracétique est de 13 ml.g^{-1} .
- La courbe de dispersion rotatoire tracée dans les mêmes conditions, conduit à une valeur de $b_0 \neq 0$ donc à un taux d'hélicité nul.
- Enfin le spectre d'absorption à l'état solide (dispersion dans KBr) présente les bandes caractéristiques de la structure β antiparallèle (voir le Tableau XV et la figure 21)

	Amide A et B	Amide I	Amide II
cm^{-1}	3280 et	1625	1515
	3050	1690	1535:épaulement
		1655:épaulement	

Tableau XV: Bandes d'absorption Infra-rouge du poly (Met-Met-Gly) (dispersé dans KBr).

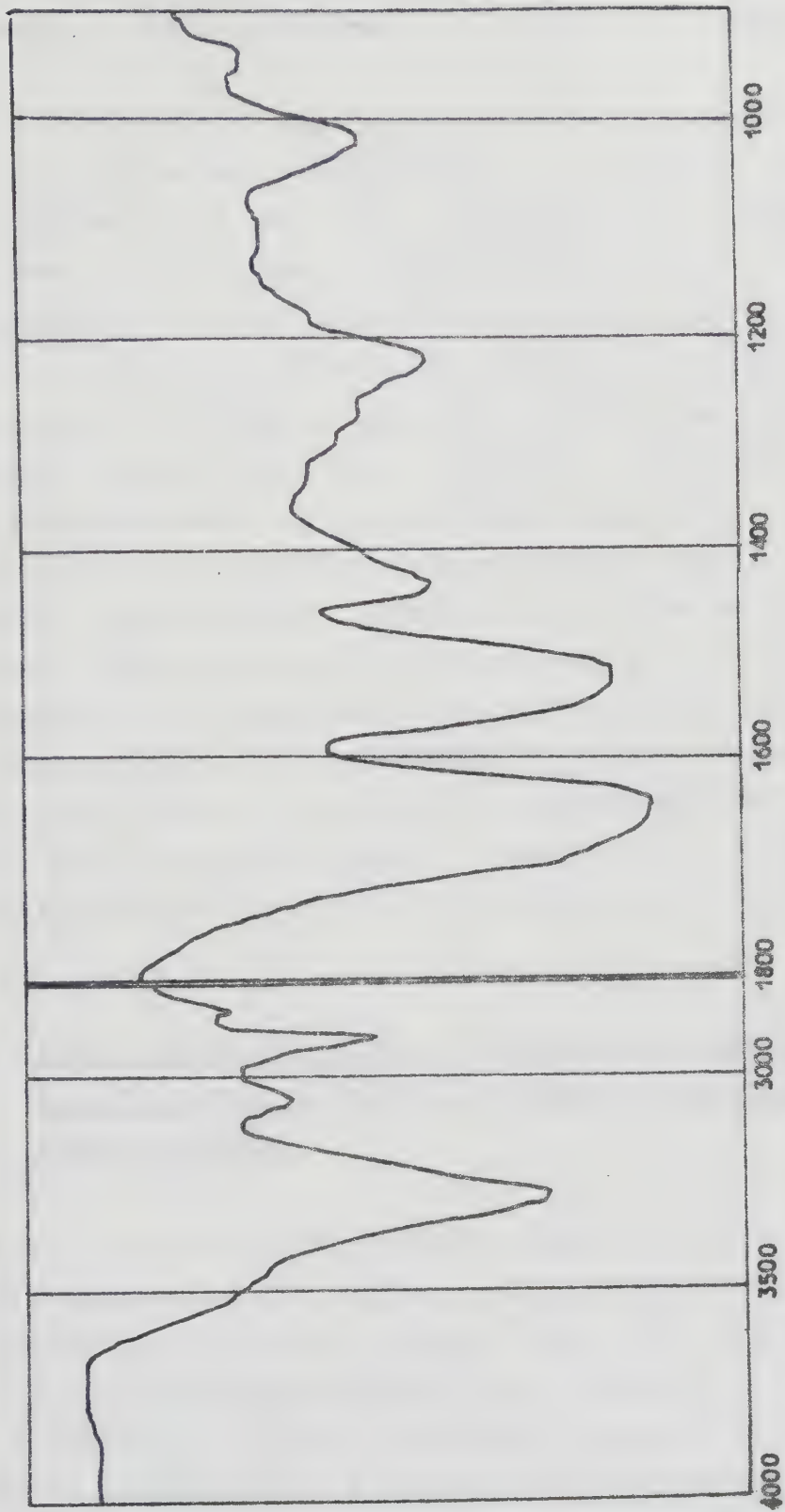


Fig. 21 - Spectre d'absorption infra-rouge d'un échantillon solide
du polytripeptide $\text{H}-(\text{Met-Met-Gly})_n\text{-OH}$ (dispersion dans KBr).

La présence d'épaulements à 1655 et 1535 cm^{-1} suggère que l'on se trouve peut-être également en présence de chaînes désordonnées.

Par ailleurs, il faut remarquer que la conformation de copolypeptides ordonnés de méthionine et de glycine n'est pas facile à prévoir. En effet, on sait que la poly L-Méthionine peut se trouver sous la forme α -hélicoïdale (³⁹) et que, par contre la polyglycine ne peut adopter, selon les cas, que la structure β (⁵⁰) ou une conformation hélicoïdale particulière appelée la polyglycine II (⁵¹) dans laquelle les liaisons hydrogène sont uniquement intermoléculaires. Cependant, certains auteurs (⁵²) après une étude des copolypeptides du type $-(\text{Ala}_x\text{-Gly}_y)_n-$ ont établi qu'une telle chaîne polypeptidique adopte la conformation que prend l'homopolymère dérivant de l'acide-amino prédominant. On pouvait donc s'attendre raisonnablement à ce que la poly (Met-Met-Gly) soit constituée en partie d'une fraction suffisamment polycondensée, α -hélicoïdale et soluble dans le chloroforme. Au contraire, nous avons obtenu un copolypeptide de viscosité faible, donc peu polycondensé, insoluble dans le chloroforme, et présentant à l'état solide principalement la conformation β .

IV.3 - CONCLUSIONS RELATIVES A L'IMPORTANCE RESPECTIVE DE LA PURETE CHIMIQUE ET DE LA PURETE STEREOCHIMIQUE DES AMINO-ESTERS ACTIVES.

Nous avons rassemblé dans le tableau XVI les principales données concernant les différentes polycondensations effectuées. A l'examen de ce tableau, on peut faire les remarques suivantes:

1°/ Les copolypeptides dont les monomères ont été préparés par la méthode B, qui sont optiquement purs et cristallins, sont hautement polycondensés (viscosité élevée) et fournissent une fraction soluble dans le chloroforme, dont la structure à l'état solide est α -hélicoïdale. Au contraire, les oligopeptides synthétisés par la méthode A, qui sont donc partiellement racémisés

.../...

Méthode de synthèse du monomère	Cristallini- té du mono- mère	Racémisa- tion du C- résidu terminal	Solubilité du poly - condensat dans CHCl ₃	Indice de viscosité dans ADCA ml.g ⁻¹	Structure à l'état solide	b ₀ dans CHCl ₃	b ₀ dans ADCA
-(Met-Ala)- _n	+	0	+	116	α	- 630	- 380
-(Met-Ala)- _n LL + LD	+	+	+	60	α	- 530	- 95
-(Met-Met-Ala)- _n	+	0	+	70	α	- 600	- 290
-(Met-Met-Ala)- _n	0	+	0	<10	principal: β ^t	-	0
-(Met-Met-Gly)- _n	0	0	0	13	principal: β ^t	-	0
-(Met-Met-Met-Ala)- _n	+	0	+	25	α	- 500	- 250

Tableau XVI : Principales données concernant les différents copolypeptides ordonnés riches en méthionine, synthétisés.

(quand l'acide-amino C-terminal n'est pas la glycine) sont difficilement cristallisables et donnent naissance à des polycondensats aux propriétés médiocres (faible degré de polycondensation, insolubilité dans le chloroforme).

2°/ Le mélange de dipeptides C-activés (L-L + L-D), obtenu artificiellement en malaxant les deux diastéréoisomères synthétisés par la voie B, parfaitement cristallins, donne après polycondensation, un polypeptide dont une fraction importante est soluble dans le chloroforme et présente une viscosité élevée.

3°/ En polycondensant le tripeptide HCl, H-Met-Met-Gly-ONp préparé par la méthode A, optiquement pur, mais difficile à obtenir sous forme de cristaux, on obtient un polymère de faible masse et ne se dissolvant pas dans le chloroforme.

De ces observations, nous déduirons que la pureté stéréochimique de l'oligopeptide utilisé comme monomère exerce une certaine influence sur les propriétés physicochimiques du copolypeptide obtenu, mais que la pureté chimique est bien plus déterminante. En effet, dans tous les cas où nous avons éprouvé quelques difficultés à purifier le peptide réactif intermédiaire - que cette difficulté provienne de la présence simultanée de deux diastéréoisomères ou qu'elle soit liée à l'existence d'impuretés - la polycondensation nous a fourni un polymère de qualité médiocre.

Si l'on s'efforce enfin de préciser l'influence de la pureté optique de l'oligopeptide sur les propriétés du polymère, on peut dire que, lorsque la longueur de la chaîne polypeptidique est suffisante pour qu'il y ait une hélice, il existe un rapport étroit entre la présence ou l'absence de diastéréoisomères dans le produit de départ et la stabilité de la structure hélicoïdale vis-à-vis des solvants tels que l'acide dichloracétique. Ceci est probablement dû au fait que lors de la polycondensation du dipeptide (L-L + L-D) dans les proportions 70% - 30%, l'incorporation de résidus dipeptidiques L-D dans l'enchaînement

.../...

principal, constitué de façon majoritaire par des résidus L-L et adoptant donc une conformation α -hélicoïdale, diminue la stabilité de cette structure en perturbant la distribution des liaisons hydrogène.

IV-4 - IMPORTANCE DE LA RACEMISATION PENDANT LA POLYCONDENSATION.

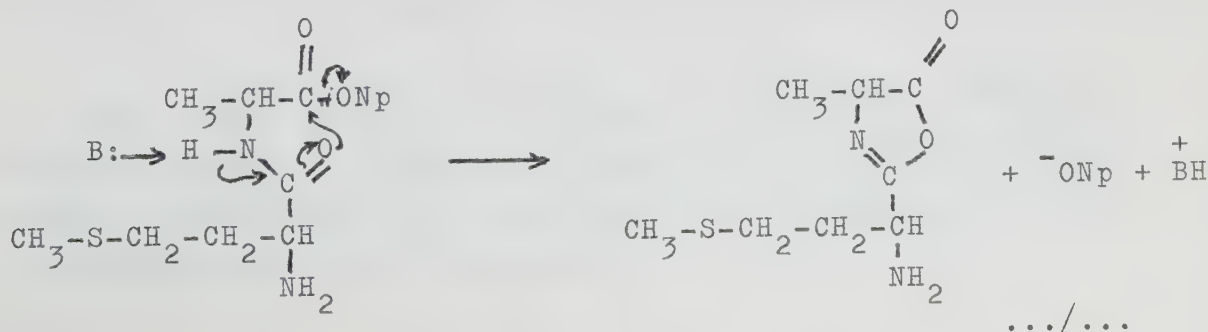
Nous avons dit que les propriétés intéressantes des copolypeptides décrits dans la II^e et III^e Partie (degré de polycondensation élevé, structure α -hélicoïdale à l'état solide, et en solution, et stabilité de cette conformation vis-à-vis de l'acide dichloracétique), semblaient indiquer qu'ils étaient doués d'une haute régularité stérique. Si l'on peut affirmer que les oligopeptides de départ sont optiquement purs, il est plus difficile de s'assurer que les polymères sont effectivement stéréoréguliers. En effet, l'étude des hydrolysats obtenus en milieu acide ne donne pas de résultats sûrs (²⁵) et les procédés biochimiques sont généralement inutilisables sur des solutions dans des solvants organiques.

Pour apporter quelques éclaircissements à ce sujet, nous avons estimé utile d'examiner plus en détail la réaction d'aminolyse des esters p.nitrophényles.

On a vu, dans la partie I.2.4. que lorsqu'un couplage du type suivant:

$$R-CO-NH-\overset{*}{C}HR'-COONp + NH_2-R'' \longrightarrow R-CO-NH-\overset{*}{C}HR-CO-NH-R'' + HONp$$

se produit, le danger d'inversion de signe optique sur le C* est important. Or c'est précisément ce genre de réactions qui est effectué lorsque l'on polycondense des esters activés de peptides. Dans le cas des dérivés dipeptidiques par exemple, la formation de l'oxazolone est très probable, et les risques de racémisation du résidu C-terminal ne sont pas négligeables.



La pureté optique d'un tétrapeptide (intermédiaire résultant du couplage entre deux monomères dipeptidiques au cours d'une polycondensation) étant difficile à contrôler, nous avons donc entrepris d'étudier, par une méthode chromatographique analogue à celle exposée dans la II^e et la III^e Partie, la racémisation qui peut survenir au cours d'une condensation du même type, mais conduisant à un tripeptide



On remarque, en effet, que dans ce modèle, le couplage a lieu entre un résidu alanyle C-terminal inclus dans un dipeptide (donc possibilité de formation de l'oxazolone comme précédemment) et un résidu méthionyle dont la fonction amine est libérée par la triéthylamine. Si cette réaction s'accompagne d'une inversion dans la configuration du résidu alanyle, il est vraisemblable que cette racémisation se produit également lors de la formation du tétrapeptide.

Description de la méthode d'étude chromatographique.

La réaction de couplage précédente a été menée dans le chloroforme à une température de 24°C. De façon à reproduire le plus fidèlement possible les conditions de polycondensation, les produits ont été dissous dans un minimum de solvant et la triéthylamine ajoutée en dernier lieu. On a laissé la réaction se poursuivre pendant quatre jours. Les contrôles chromatographiques ont été effectués sur le mélange réactionnel sans isoler le tripeptide formé, les taches données par les réactifs de départ et le p.nitrophénol ayant été identifiées au préalable.

Nous avons tout d'abord préparé le tripeptide NPS-LMet-DLAla-LMet-OMe en partant du dipeptide NPS-LMet-DLAla-ONp, de façon à sélectionner un éluant capable de séparer les deux diastéréoisomères du tripeptide.

.../...

En opérant sur couche mince de silice (DC-Alurolle Kiesegel F 254 Merck-épaisseur 0,20 mm), à l'aide d'un mélange éther éthylique-isopropanol (20-0,25 v/v) nous avons obtenu deux taches différentes pour le mélange des deux épimères à des R_f respectifs de 0,52 et 0,56.

Par la suite, en faisant un contrôle chromatographique, dans les mêmes conditions, à des intervalles de temps réguliers, de la réaction :



nous n'avons toujours obtenu qu'une seule tache de $R_f = 0,56$ correspondant au diastéréoisomère L-L-L, ce qui prouve donc que ce couplage s'effectue sans racémisation, tout au moins dans les conditions de l'expérience.

En conclusion, nous sommes amené à penser que les copolypeptides étudiés sont doués d'une haute régularité stérique pour les raisons suivantes:

- d'une part les copolypeptides préparés à partir de monomères optiquement purs possèdent des propriétés physicochimiques intéressantes et en particulier leur structure α -hélicoïdale est stable vis-à-vis de l'acide dichloracétique - on a vu que cette propriété disparaissait lorsque des résidus de configuration D étaient introduits dans la chaîne-.
 - en second lieu le couplage modèle décrit plus haut s'effectue sans inversion du signe optique du résidu alanyl, ce qui nous permet de supposer que les premiers oligopeptides formés au début de la polycondensation sont stéréoréguliers.
 - enfin selon certains auteurs (⁵³), lorsqu'un polypeptide est susceptible d'être hélicoïdal, il existerait au cours de la polycondensation du monomère peptidique un stade d'"accélération conformationnelle" dû à la formation de chaînes hélicoïdales; cette accélération ne permettrait donc plus aux oligopeptides activés présents dans le milieu réactionnel de se racémiser et conduirait ainsi à des chaînes stéréorégulières.
-

C O N C L U S I O N

Dans les premières pages de ce mémoire, nous avons précisé que l'objectif que nous nous étions assigné, était de sélectionner la meilleure méthode permettant de synthétiser des copolypeptides assemblant les unités alanyle et méthionyle et doués d'une haute régularité stérique.

A notre avis, le succès dans une telle entreprise devait nous permettre d'obtenir des biopolymères de poids moléculaire élevé et demeurant toutefois solubles dans des solvants comme le chloroforme : en effet sa manipulation est aisée et on connaît sa grande transparence dans les domaines de l'infra-rouge où les dérivés peptidiques sont étudiés.

Ces milieux étant relativement peu actifs, on pouvait attendre que les solutés polypeptidiques y demeurent en conformation hélicoïdale, ce qui permettait d'envisager des études sur les transitions hélice-pelote et sur les corrélations qui peuvent exister entre la stabilité de la forme hélicoïdale et la structure primaire du polypeptide étudié.

Ayant choisi de polycondenser des oligopeptides terminés par le résidu alanyle et C-activés par une fonction ester p. nitrophénylique, et craignant qu'un dipeptide ne conduise à une quantité trop importante de dicétopipérazine, notre premier travail a eu pour but de préparer le tripeptide HCl, H-Met-Met-Ala-ONp par la voie la plus couramment employée (voies que nous

avons notée A) qui consiste à activer la fonction carboxylique de l'oligopeptide juste avant la polycondensation.

Le polytripeptide ainsi obtenu se révélait insoluble dans le chloroforme, et possédait un indice de viscosité et un b_0 peu élevés ($[\eta] = 11 \text{ ml g}^{-1}$, $b_0 = -225$, CHCl_3 - ADCA 90-10).

Estimant que l'insuffisance de ces résultats pouvait provenir d'un défaut de pureté optique du monomère utilisé, nous avons été amené à nous intéresser plus particulièrement aux conditions dans lesquelles on peut condenser des résidus peptidiques sans provoquer d'inversion dans leur configuration.

C'est ainsi que nous avons entrepris de mettre au point, sur un ester p.nitrophénylique de dipeptide N-protégé, une méthode chromatographique permettant de mettre en évidence une petite quantité de diastéréoisomère parasite présent dans un peptide, préparé à partir d'acides aminés L. Simultanément, nous avons donc préparé ce dipeptide par la méthode A précédemment citée et par la méthode B (ou méthode de GOODMAN et STUEBEN) qui consiste à protéger la fonction carboxylique de l'acide aminé C-terminal, par l'ester actif choisi, dès le départ des réactions. Nous avons alors constaté, sur le dipeptide NPS-Met-Ala-ONp, que la méthode A conduisait à un mélange de diastéréoisomères L-L + L-D dans les proportions respectives de 70% et 30% alors que par la méthode B, nous obtenions un peptide optiquement pur.

Bien que les risques de cyclisation fussent importants au cours de la polycondensation d'un dipeptide, nous l'avons cependant effectuée sur cet oligopeptide préparé par la méthode B et donc stéréochimiquement pur. Cela nous a permis, après avoir éliminé la dicétopipérazine formée, d'isoler une fraction soluble dans le chloroforme, constituant environ 20% du rendement théorique global, et possédant un indice de viscosité élevé même dans l'acide dichloracétique ($[\eta] \geq 100 \text{ ml.g}^{-1}$ ADCA). L'étude à l'état solide de cette fraction, par spectroscopie infra-rouge et par diffraction des rayons X nous a permis de

conclure à une structure α -hélicoïdale qui se conserve lorsque le polypeptide est dissous dans le chloroforme et qui est stable vis-à-vis de l'acide dichloracétique.

De la même manière le tripeptide NPS-Met-Met-Ala-ONp a pu être synthétisé en utilisant la méthode B, et après avoir vérifié par chromatographie qu'il était stéréochimiquement pur, nous l'avons polycondensé. Le polytripeptide brut (100% du rendement théorique) fournit, après extraction au chloroforme, une fraction correspondant environ à 50% du polymère, et dont les propriétés physicochimiques sont tout à fait comparables à celles de la partie soluble du polydipeptide.

Quant à la polycondensation du tétrapeptide activé synthétisé également par la voie B, elle a conduit à des résultats moins intéressants que pour les deux précédents. En effet, bien que le rendement de la fraction soluble soit encore relativement élevé, de l'ordre de 30%, sa viscosité n'est que de 40 ml.g^{-1} dans des solvants riches en chloroforme, c'est-à-dire trois à quatre fois plus faible que pour les copolypeptides ordonnés décrits plus haut; ceci laisse donc à penser que le polymère est relativement peu polycondensé. La raison peut en être que, comme le tétrapeptide activé utilisé comme monomère est très peu soluble dans les solvants de recristallisation usuels, nous n'avons pu parvenir à éliminer totalement la dicyclohexylurée et surtout le chlorhydrate de dicyclohexylamine, et cette dernière impureté perturbe peut-être le déroulement de la polycondensation. Par ailleurs le polytétrapeptide adopte la structure α -hélicoïdale en solution chloroformique et cette conformation reste stable vis-à-vis de l'acide dichloracétique.

En comparant ces derniers résultats avec les propriétés médiocres du polytripeptide synthétisé à partir de l'oligopeptide partiellement racémisé, la tentation était forte d'imputer à la seule pureté optique du monomère la qualité des polypeptides

obtenus, bien que selon l'avis de certains auteurs, l'existence d'une structure β (mise en évidence dans le premier polytripeptide à l'état solide) soit incompatible avec l'existence de résidus inversés. Nous avons donc cherché à mettre en évidence le rôle respectif que jouent la pureté optique et la pureté chimique du monomère au cours de la polycondensation de peptides activés. Nous avons tout d'abord vérifié que la pureté chimique avait une grande influence sur le degré de polycondensation du polypeptide et par suite sur sa solubilité dans le chloroforme et sa conformation qui lui semblent liés. En effet, en polycondensant un tripeptide terminé par un résidu glycyle donc optiquement pur, mais difficilement cristallisable par suite de la présence d'impuretés difficiles à éliminer, nous avons obtenu un polymère aux propriétés médiocres ($[\eta]_{10\text{ml.g}^{-1}}^{\text{ADCA}}$).

Au contraire, la pureté stéréochimique du monomère n'influence que faiblement les caractères physicochimiques du polypeptide car en polycondensant un mélange de diastéréoisomères du dipeptide HCl, H-Met-Ala-ONp, nous avons isolé un copolypeptide analogue à ceux préparés à partir d'oligopeptides stéréoréguliers, mais dont la structure hélicoïdale en solution est beaucoup moins stable vis-à-vis des solvants riches en acide dichloracétique.

De toutes ces observations, il résulte que pour préparer des copolypeptides ordonnés de haut poids moléculaire et stéréoréguliers, il est nécessaire de synthétiser des monomères activés parfaitement cristallins - donc aisément purifiables - et optiquement purs; en utilisant la méthode de M.GOODMAN et K.C.STUEBEN (méthode B) et en employant comme groupes N-protecteurs, des groupes éliminables dans des conditions douces, nous avons obtenu les esters p.nitrophényliques de di-, tri- et tétra-peptides qui nous ont fourni par polycondensation, des copolymères possédant les propriétés attendues.

.../...

Enfin, à notre avis, la meilleure façon de synthétiser une structure polypeptidique périodique de formule générale $(\text{Met}_x\text{Ala})_n$ consiste à polycondenser le tripeptide activé $\text{HCl}, \text{H-Met}_2\text{-Ala-ONp}$; en effet le dipeptide conduit à une quantité importante de dicétopipérazine et le tétrapeptide, non seulement représente une étape de plus dans la synthèse du monomère mais de plus, à cause de sa faible solubilité dans les solvants usuels, contient quelques impuretés et le polymère qui en résulte est peu polycondensé. Au contraire, le tripeptide synthétisé par la méthode B permet de préparer, avec un rendement global de 100% un polymère brut dont la moitié environ est soluble dans le chloroforme et possède des propriétés physicochimiques intéressantes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion généralement déterminés sur un microscope à point de fusion Reichert, ne sont pas corrigés.

Les contrôles chromatographiques courants sont effectués sur une couche mince de gel de silice en utilisant comme éluants les mélanges ternaires pyridine-heptane-tertiobutanol (1:5:1) ou acide formique-eau-isobutanol (3:2:15). Le révélateur utilisé est l'iode, le procédé à l'hypochlorite (54) ne donnant aucune coloration avec les peptides contenant le résidu méthionyle. Les spectres dans l'infra-rouge ont été enregistrés avec un appareil PERKIN-ELMER 421. Les produits, généralement examinés sous forme solide après dispersion dans une pastille de bromure de potassium sont caractérisés par les fréquences (cm^{-1}) de leurs principales bandes d'absorption.

Les courbes de dispersion rotatoire optique ont été tracées avec un spectropolarimètre S.O.F.I.C.A. et les valeurs du pouvoir rotatoire ont été mesurées avec le micropolarimètre JOUAN.

Les examens dans l'ultra-violet ont été effectués sur des solutions à l'aide d'un spectromètre Beckman D.K.2A.

Les masses moléculaires moyennes en poids des copolypeptides ont été déterminées par la méthode de l'équilibre de sédimentation, avec une ultracentrifugeuse SPINCO Modèle E.

Enfin, les mesures tonométriques ont été effectuées à 25°C avec un osmomètre à tension de vapeur HEWLETT-PACKARD 302.

I - SYNTHÈSE DU TRIPEPTIDE HCl, H-Met-Met-Ala-ONp par la METHODE A et POLYCONDENSATION.

Sauf indication contraire, tous les acides aminés de départ, sont des isomères L.

Z-Met-OH : N-Benzylloxycarbonyl-méthionine.

Préparée suivant la méthode de M. BERGMANN et L. ZERVAS (21). Purifiée par précipitation en ajoutant de l'éther de pétrole à une solution dans l'acétate d'éthyle.

$R_d^t = 75 \%$

$F = 69^\circ\text{C}$

$[\alpha]_{546}^{20} = -17,0^\circ$

($c = 1$, Acide acétique) .../...

Z-Met-Ala-OMe: N-benzyloxycarbonyl-méthionyl-alaninate de méthyle.

A une solution contenant 2,78 g (20 mM) de HCl, H-Ala-OMe (F = 109°C) dans 100 ml de chloroforme, on ajoute 2,8 ml (20mM) de triéthylamine. Après avoir évaporé à sec, on reprend par 100 ml de chlorure de méthylène dans lequel on dissout 5,66 g (20 mM) de Z-Met-OH. Après refroidissement à 0°C, on introduit 4,12 g (20 mM) de dicyclohexylcarbodiimide en agitant vigoureusement. La réaction est poursuivie pendant 4 heures, délai au bout duquel on filtre la dicyclohexylurée formée, on évapore à sec le filtrat et on reprend par 100 ml d'acétate d'éthyle. Cette solution est successivement lavée par de l'acide citrique et du bicarbonate de sodium (solutions aqueuses à 5%) et par de l'eau. On sèche sur sulfate de sodium, amène à sec et on recristallise plusieurs fois le résidu ainsi obtenu dans l'éthanol. On obtient ainsi 5,8 g (15,8 mM-Rdt. 79%) du dipeptide recherché.

F = 117 °C

$$[\alpha]_{546}^{12} = + 3,8^{\circ} (c = 1,1 \text{ CHCl}_3)$$

Analyse : $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{SN}_2$ M = 368

Calc.% : C = 55,43 H = 6,52 S = 8,69 N = 7,61

Tr. : 55,39 6,53 9,01 7,75

Spectre IR (dans KBr)

3300 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3060 (faible), 1739 (COOMe), 1686 (Z, Amide I),

1645 (Amide I), 1535 (Amide II).

HCl, H-Met-Ala-OMe : Chlorhydrate de méthionyl-alaninate de méthyle.

On chauffe au reflux, pendant 45 mn une solution contenant 3,68 g (10 mM) de l'intermédiaire précédemment décrit dans 10 ml d'acide trifluoroacétique. Le solvant est alors éliminé sous vide et on reprend par quelques millilitres d'éthanol. On précipite finalement le chlorhydrate du dipeptide en ajoutant de l'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique. Le produit est purifié plusieurs fois par dissolution dans l'éthanol et précipitation par l'éther. Il est très hygroscopique et est conservé, après séchage sous vide, pour une transformation ultérieure.

Z-Met-Met-Ala-OMe : N-benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-alaninate de méthyle.

On reproduit avec le chlorhydrate précédent l'opération qui avait permis de condenser HCl, H-Ala-OMe sur la Z-Met-OH. Le dérivé recherché est obtenu avec un rendement de 78%.

.../...

On le purifie par recristallisation dans l'éthanol.

F = 156°C

$[\alpha]_{546}^{12} = -15,9^\circ$ (c = 1,7 CHCl₃)

Analyse : C₂₂H₃₃S₂N₃ M = 499

Calc.% : C=52,90 H=6,61 S=12,82 N=8,41

Tr. : 52,91 6,65 12,77 8,73

Spectre I.R.(dans KBr)

3300 (ν_{N-H}), 3070 (faible, 1744(COOMe), 1688 (Z, Amide I),
1637 (Amide I), 1540 (Amide II).

Z-Met-Met-Ala-OH : N-benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-alanine.

Dans une solution maintenue à 0°C et contenant 4,99 g (10 mM) de l'ester tripeptidique précédent dans un mélange diaxane-acétone (90-10), on introduit en agitant 11 ml de soude 1N (11mM) Le mélange est maintenu pendant une nuit au réfrigérateur. On ajoute ensuite 11 ml d'acide chlorhydrique 1N et on élimine les solvants sous vide. Le résidu solide est recristallisé plusieurs fois dans un mélange éthanol-eau (10-2). On obtient 3,98 g (8,2 mM- Rd^t. = 82%) du tripeptide recherché.

F = 166°C

$[\alpha]_{546}^{12} = -34^\circ$ (c = 0,5 EtOH)

Analyse : C₂₁H₃₁O₆S₂N₃ M = 485

Calc.% : C = 51,96 H= 6,39 S = 13,19 N = 8,66

Tr. : 51,78 6,45 13,31 8,80

Spectre I.R. (dans KBr)

3300 (ν_{N-H}), 3060 (faible), 1725-1717 (CO₂H dédoublé),
1962 (Z, Amide I), 1647 (Amide I), 1535 (Amide II).

Z-Met-Met-Ala-ONp : N-benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle.

Dans une solution maintenue à 0°C et contenant 1,94 g (4mM) de Z-Met-Met-Ala-OH et 0,61 g (4,4 mM) de p.nitrophénol dans 40 ml de diméthylformamide, on ajoute 0,90 g (4,4 mM) de dicyclohexylcarbodiimide et on agite pendant 24 h. Après filtration de la dicyclohexylurée formée, on élimine le solvant sous vide, et le résidu trituré par l'éther de pétrole est finalement redissous dans l'acétate d'éthyle. L'ester p.nitrophénylique recherché peut être alors précipité par addition d'éther de pétrole et on le recristallise dans un mélange chloroforme-éther de pétrole. Il est en effet préférable d'éviter tout contact prolongé avec un alcool car on observe alors une transes-térification du réactif.

On obtient finalement 1,6 g (2,6 mM - Rd^t = 65 %) de produit pur.

.../...

Le composé qui est obtenu dans ces conditions fond à 135°C sur le banc de Kofler.

Si on le porte préalablement pendant 24 h. dans une étuve à 110°C, la température de fusion observée s'élève à 172°C. Pourtant, aucune différence ne peut être décelée dans le pouvoir rotatoire, le spectre d'absorption infrarouge, et le comportement chromatographique des deux variétés de produit.

Examiné au microscope REICHERT, le dérivé fond à 177°C.

$$\left[\alpha \right]_{546}^{12} = -40,6^{\circ} \quad (c=1 \text{ CHCl}_3)$$

Analyse : $C_{27}H_{34}O_8S_2N_4$ M = 606

Calc. % : C = 53,46 H = 5,61 S = 10,56 N = 9,24

Tr. : 53,29 5,75 10,54 9,28

Spectre I.R. (dans KBr)

3290(ν_{N-H}), 3070(faible), 1767(COONp), 1687(Z, Amide I),
1639 (Amide I), 1617 (faible), 1550-1525 (large, Amide II,
NO₂), 1435 (NO₂)

Spectre U.V. : $\lambda_{max.} = 269 \text{ m}\mu$ (COONp).

HCl, H-Met-Met-Ala-ONp : Chlorhydrate de méthionyl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle.

On chauffe au reflux, pendant 45 mn, une solution contenant 2,8 g (4,6 mM) du tripeptide N-protégé précédent dans 4,6 ml d'acide trifluoroacétique. Le solvant est ensuite éliminé sous vide et le résidu huileux est repris par quelques millilitres de chloroforme. Le tripeptide recherché est précipité à l'état de chlorhydrate par addition d'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique. Le produit est purifié plusieurs fois par des recristallisations dans un mélange isopropanol-éther anhydre. On obtient ainsi 2,05 g (4,03 mM, Rdt = 88%) d'un réactif très hygroscopique.

L'analyse révèle un excès de chlore dû vraisemblablement à de l'acide chlorhydrique adsorbé.

$$\left[\alpha \right]_{546}^{18} = -6,7^{\circ} \quad (c = 0,9 \text{ diméthylformamide})$$

Analyse: $C_{19}H_{29}N_4O_6S_2Cl$ M = 508,5

Calc. % : Cl = 6,98

Tr. : 10,54

Spectre I.R. (dans KBr)

3200-3000 (très large), 1769 (COONp), 1680-1650 (large),
1616 (faible), 1550 (Amide II), 1525 (NO₂), 1345 (NO₂).

Spectre U.V. : $\lambda_{max.} = 269 \text{ m}\mu$ (chloroforme).

.../...

Poly-(méthionyl-méthionyl-alanine) :

A une solution contenant 2,05 g (4,03 mM) du chlorhydrate du tripeptide activé précédant dans 1 ml de chloroforme, on ajoute, en agitant, 0,86 ml (6,11 mM) de triéthylamine et on abandonne le mélange pendant 48 h. à température ambiante. Après dilution par l'éther, le précipité obtenu est filtré, puis lavé successivement à l'eau, l'éthanol et l'éther. Après un lavage prolongé à l'éthanol, il est isolé définitivement par centrifugation. On obtient ainsi 770 mg (2,3 mM - $R_d^t = 58\%$) d'une poudre jaunâtre qui fond à une température supérieure à 320°C. Insoluble dans la plupart des solvants usuels, le produit en question se dissout très légèrement dans le chloroforme, partiellement dans le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde et totalement dans l'acide formique et l'acide dichloracétique.

$$[\alpha]_{546}^{18} = -16,0^\circ \quad (c = 0,6 - \text{mélange } \text{CHCl}_3\text{-ADCA } 95\text{-}5)$$

Analyse : $(\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{S}_2\text{N}_3, 0,5 \text{ H}_2\text{O})_n$

Calc.% : C = 45,75 H = 7,03 N = 12,31

Tr. : 44,71 6,50 12,27

II - SYNTHÈSE DU DIPEPTIDE HCl, H-Met-Ala-ONp PAR LA METHODE B ET POLYCONDENSATION - PREPARATION DES COMPOSES MODELES POUR LE CONTROLE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA PURETE OPTIQUE DES ECHANTILLONS.

Sauf indication contraire, tous les acides aminés de départ sont les isomères L.

NPS-ALA-OH : N.O.nitrophénylsulfénylalanine.

On dissout, en agitant 3,6 g (40 mM) de L-alanine dans une solution contenant 20 ml de soude 2N et 50 ml de dioxane. En maintenant l'agitation, on introduit progressivement 8,34 g (44 mM) de chlorure d'o.nitrophénylsulfényle tout en laissant tomber goutte à goutte, dans le milieu réactionnel 22 ml de soude 2 N. Le mélange est alors dilué à 250 ml par de l'eau distillée. On élimine par filtration le disulfure qui a précipité et on porte le filtrat à pH 3 par addition d'acide sulfurique N. Le précipité formé est isolé, redissous dans l'acétate d'éthyle, et la solution ainsi obtenue est séchée sur sulfate de sodium. Le solvant est chassé sous pression réduite et le résidu solide est purifié par recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole.

$R_d^t = 85\%$ $F = 130^\circ\text{C}$

$$[\alpha]_{589}^{22} = -102,3^\circ \quad (c = 1,1 \text{ diméthylformamide})$$

.../...

Spectre I.R. (dans KBr)

3360,1725 (COOH), 730 (NPS-)

Spectre U.V. : $\lambda_{\max.} = 380 \text{ m}\mu$ (dans MeOH).

NPS-Ala-ONp : N-.nitrophénylsulfényl-alaninate de p.nitrophényle.

Dans 35 ml d'acétate d'éthyle anhydre, on dissout en agitant 4,84 g (20 mM) de NPS-Ala-OH fraîchement préparé et 3,06 g (22 mM) de p.nitrophénol. Après avoir refroidi la solution à 0°C, on introduit 4,13 g (20 mM) de dicyclohexylcarbodiimide. La réaction se poursuit pendant une demi-heure à 0°C. On ramène alors le mélange à la température ambiante et on l'abandonne pendant quelques heures en maintenant l'agitation. La dicyclohexylurée qui a précipité est éliminée par filtration et le filtrat est lavé rapidement avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5%, puis à l'eau. La couche organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite. On isole ainsi une huile qui est redissoute dans l'acétate d'éthyle et la solution est laissée pendant une nuit à -30°C. On élimine la dicyclohexylurée qui a pu éventuellement se déparer et on recueille finalement le dérivé recherché sous forme d'huile en évaporant l'acétate d'éthyle sous vide. Il ne nous a jamais été possible d'obtenir le N-.nitrophénylsulfényl-alaninate de p.nitrophényle sous forme cristallisée.

HCl, H-Ala-ONp : Chlorhydrate d'alaninate de p.nitrophényle.

L'huile précédemment obtenue est traitée par 15 ml d'une solution méthanolique 3N d'acide chlorhydrique. Après quelques minutes de contact, la solution est devenue limpide et on ajoute de l'éther anhydre jusqu'au point de trouble. Le chlorhydrate recherché précipite rapidement. Il est isolé et purifié par dissolution dans un mélange alcool absolu-acide acétique et re-précipitation par addition d'éther anhydre.

$R_d^t = 50 \%$ (par rapport à NPS-Ala-OH)

$T_f = 195-198^\circ\text{C}$

$[\alpha]^{22}_{589} = -24,1^\circ$ (c = 1 diméthylformamide)

Analyse: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}$ M = 246,5

Calc.% : C = 43,81 H = 4,46 N = 11,36 Cl = 14,40

Tr. : 43,65 4,47 11,41 14,35

Spectre I.R. (dans KBr):

3000-2800 (large), 1780 (COONP), 1535 (NO₂), 1355 (NO₂)

Spectre U.V. : $\lambda_{\max.} = 270 \text{ m}\mu$ (COONP)

.../...

NPS-Met-OH,DCHA : Sel de dicyclohexylammonium de la N. c .
nitrophénylsulfénylméthionine.

La substitution de la méthionine par le chlorure d'o .nitro-
phénylsulfényle s'effectue dans les mêmes conditions que pour
l'alanine. L'huile formée est dissoute dans l'acétate d'éthyle
et cette solution organique est lavée à l'eau distillée, puis
séchée sur sulfate de sodium anhydre. L'addition de 8 ml de di-
cyclohexylamine provoque la précipitation du sel d'ammonium
recherché et celui-ci est finalement purifié par recristallisa-
tion dans le méthanol.

Rd^t = 60 % F = 196°C

$[\alpha]_{589}^{20} = -33,5^{\circ}$ (c=1 MeOH)

Analyse : C₂₃H₃₇N₃O₄S₂ M = 483

Calc.% : C = 57,14 H= 7,66 N= 8,69 S = 13,25

Tr. : 56,91 7,72 8,67 13,39

Spectre I.R.(dans KBr) : 1630,730 (NPS)

Spectre U.V. : $\lambda_{\text{max.}}$ = 380 mμ (dans MeOH)

NPS-Met-Ala-ONp : N.o.nitrophénylsulfényl-méthionyl-alaninate
de p.nitrophényle.

Dans 120 ml de chloroforme, on dissout en agitant 4,83 g
(10 mM) du sel précédent. Après avoir refroidi à 0°C, on intro-
duit 2,06 g (10 mM) de dicyclohexylcarbodiimide et 2,46 g (10mM)
de HCl,H-Ala-ONp. Après 1 h.de contact, on laisse le mélange
revenir à température ambiante et on maintient sous agitation
pendant plusieurs heures. La suspension obtenue est alors fil-
trée et le filtrat est évaporé sous pression réduite. On isole
ainsi un résidu qui est dispersé dans la méthyléthylcétone et
filtré. Le produit recherché est obtenu après avoir chassé le
solvant sous vide. Il est recristallisé dans un mélange butano-
ne-éther de pétrole.

Rd^t = 75 % F =155-156°C (décomposition)

$[\alpha]_{589}^{22} = - 68,6^{\circ}$ (c=1, MeCN)

Analyse: C₂₀H₂₂N₄O₇S₂ M=494

Calc.%: C=48,58 H=4,45 N=11,34 S=12,96

Tr. : 49,05 4,73 11,38 12,83

Spectre I.R. (dans KBr) :3360,3290,,1760 (COONp),1650(Amide I),
735 (NPS).

Spectre U.V. : 380 mμ (dans MeCN)

.../...

HCl, H-Met-Ala-ONp : Chlorhydrate de méthionyl-alaninate de p. nitrophényle.

On introduit 2,5 g (5 mM environ) du réactif précédemment préparé dans 7 à 8 ml d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique 3N. Le milieu devient limpide après quelques minutes de réaction. On ajoute alors en agitant 150 ml d'éther anhydre. Le chlorhydrate recherché précipite rapidement. Il est isolé et purifié par recristallisation dans l'acétonitrile anhydre.

Rd^t = 85 % F = 138-140°C (décomposition)

$$\left[\alpha \right]_{589}^{21} = -29,5^{\circ} \quad (c=1 \text{ HMPT})$$

Analyse : C₁₄H₂₀N₃O₅SCl M = 377,5

Calc.% : C= 44,50 H=5,30 N=11,13 S=8,48 Cl=9,40

Tr. : 44,68 5,32 11,17 8,44 9,45

Spectre I.R. (dans KBr)

3200-3000 (large), 1770 (COONp), 1660 (Amide I), 1345 (NO₂)

Spectre U.V. : λ_{max.} = 270 mμ (dans MeCN).

Poly(méthionyl-alanine):

Après avoir pesé 3,775 g (10 mM) du dipeptide activé précédemment obtenu, on le brasse avec 4 ml de chloroforme, on introduit 1,4 ml de triéthylamine et on laisse le mélange pendant 48 heures à température ambiante dans une fiole soigneusement bouchée. Le polycondensat brut formé est dispersé dans quelques millilitres de chloroforme et on évapore ensuite à sec. Le résidu est lavé successivement à l'eau, l'alcool et l'éther. Chacune de ces opérations est effectuée en broyant le polymère au contact du solvant et en rassemblant ensuite le solide par centrifugation. Le produit est finalement séché sous vide à 80°C. On obtient ainsi le copolypeptide brut à partir duquel une série d'extractions sélectives permettent d'isoler les fractions dont les propriétés ont déjà été décrites en détail.

Rd^t = 50 % F = supérieur à 350°C

Analyse : (C₈H₁₄N₂O₂S)_n

Calc.% : C = 47,52 H = 6,93 N = 13,86 S = 15,84

Tr. : 47,99 7,23 13,76 15,72

.../...

-Préparation des composés modèles pour le contrôle chromatographique de la pureté optique des échantillons précédemment décrits.

L-Alanine (produit commercial)

$$[\alpha]_{546}^{22} = + 17,5^{\circ} \quad (c = 2 \text{ HCl } 2N)$$

D-Alanine (produit commercial)

$$[\alpha]_{546}^{22} = - 17,3^{\circ} \quad (c=2 \text{ HCl } 2N)$$

NPS-DAla-OH : préparé comme NPS-Ala-OH.

$$F = 129^{\circ}C \quad [\alpha]_{589}^{20} = + 99,5^{\circ} \quad (c=1 \text{ diméthylformamide})$$

Analyse : $C_9H_{10}N_2O_4S$ $M = 242$

Calc.% : C = 44,62 H = 4,12 N = 11,57 S = 13,22

Tr. : 44,55 4,11 11,85 13,08

Spectre I.R. (dans KBr) : 3365,3060,1730(COONp),732(NPS).

HCl,H-DAla-ONp : préparé comme HCl,H-Ala-ONp.

$$F = 195-198^{\circ}C \quad [\alpha]_{589}^{22} = + 23,6^{\circ} \quad (c=1 \text{ diméthylformamide})$$

Analyse: $C_9H_{11}N_2O_4Cl$ $M = 247,5$

Calc.% : C = 43,81 H = 4,46 N = 11,36

Tr. : 43,87 4,70 11,34

Spectre I.R. (dans KBr) : 1780 (COONp)

NPS-Met-DAla-ONp : préparé comme NPS-Met-Ala-ONp.

$$F = 150^{\circ}C \quad [\alpha]_{589}^{23} = -52,1^{\circ} \quad (c=0,5 \text{ acétonitrile})$$

Analyse: $C_{20}H_{22}N_4O_7S_2$ $M = 494$

Calc.% : S = 12,96

Tr. : 13,01

Spectre I.R. (dans KBr) : 3300, 3270, 1760 (COONp),1648 (Amide I)
735 (NPS).

.../...

NPS-Met-Ala-OMe : N.3.nitrophénylsulfényl-méthionyl-alaninate de méthyle.

On dissout 4,83 g (10 mM) de NPS-Met-OH,DCHA dans 100 ml de chloroforme et après refroidissement de la solution à 0°C, on ajoute sous agitation 2,06 g (10 mM) de dicyclohexylcarbodiimide et 1,4 g (10 mM) de HCl,H-Ala-OMe. On laisse la solution revenir à température ambiante et après plusieurs heures on filtre l'urée et le chlorhydrate de dicyclohexylamine formés. On évapore le filtrat sous vide, reprend par l'acétate d'éthyle et on lave la solution par l'acide citrique aqueux à 5%, le bicarbonate de sodium aqueux à 5% et l'eau. Après séchage de la solution sur Na_2SO_4 , on précipite l'ester par l'éther de pétrole. Le dipeptide est recristallisé dans le mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole.

$$\text{Rd}^t = 85\% \quad F = 95^\circ\text{C}$$

$$[\alpha]_{589}^{20} = -61,3^\circ \quad (c=1 \text{ MeOH})$$

Analyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$ $M = 387$

$$\text{Calc.}\% = \text{N} : 10,85$$

$$\text{Tr.} = 10,83$$

Spectre I.R. (dans KBr) : 3330, 1750-1740 (COOMe dédoublée), 1652 (Amide I), 735 (NPS).

NPS-Met-Ala-OH,DCHA : sel de dicyclohexylammonium de la N.3.nitrophénylsulfényl-méthionyl-alanine.

On dissout 3,87 g (10 mM) du dipeptide précédent dans 20 ml de méthanol et, à la solution maintenue à 0°C on ajoute 10 ml de soude 1N. On laisse une heure à 0°C et, après avoir vérifié par chromatographie sur couche mince, que la réaction de saponification est terminée, on dilue avec 100 ml d'eau. On acidifie ensuite le mélange jusqu'à pH 3, on extrait l'huile formée par l'acétate d'éthyle et on sèche la solution sur Na_2SO_4 . Après filtration, on ajoute 2 ml de dicyclohexylamine. On filtre le précipité qui se forme et on le recristallise dans un mélange acétate d'éthyle/alcool absolu.

$$\text{Rd}^t = 90\% \quad F = 165^\circ\text{C}$$

$$[\alpha]_{589}^{22} = -38,2^\circ \quad (c=0,9 \text{ MeOH})$$

Analyse: $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$ $M = 554$

$$\text{Calc.}\% : \text{N} = 10,11 \quad \text{S} = 11,55$$

$$\text{Tr.} : 10,09 \quad 11,62$$

Spectre I.R.(dans KBr): 3350, 1630, 730 (NPS)

.../...

NPS-Met-Ala-ONp: N.o.nitrophénylsulfényl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle (préparé à partir de NPS-Met-Ala-OH, DCHA.)

Dans une ampoule à décanter contenant 50 ml d'eau distillée et 12 ml de H_2SO_4 1N, on ajoute 5,55 g (10 mM) du dipeptide précédent et 50 ml d'acétate d'éthyle. Après séchage de la solution sur Na_2SO_4 , on filtre, on refroidit à 50°C et on ajoute 1,53 g (11 mM) de p.nitrophénol et 2,06 g (10 mM) de dicyclohexylcarbodiimide. On laisse ensuite la réaction se poursuivre pendant quelques heures à température ambiante. Après filtration de l'urée formée, on concentre la solution sous vide et on ajoute de l'éther de pétrole. Le produit est recristallisé dans un mélange éthylméthylcétone/éther de pétrole.

$\text{Rd}^t = 70\%$ $F = 136-139^\circ\text{C}$ (décomposition banc de Kofler)

$[\alpha]_{589}^{21} = -63,3^\circ$ ($c=1$ acétonitrile)

Analyse: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$ $M = 494$

Calc.% : $\text{N} = 11,34$ $\text{S} = 12,96$

Tr. : 11,40 12,95

Spectre IR. (dans KBr) : 3280, 1770 (COONp), 1652, 735 (NPS.)

Z-Met-DL ALA-OMe : préparé comme Z-Met-Ala-OMe décrit dans le paragraphe I de la partie expérimentale, en utilisant la DL-Alanine au lieu de l'isomère L.

$F = 114-117^\circ\text{C}$ $[\alpha]_{546}^{21} = -13,9^\circ$ ($c=1$ MeOH)

Analyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $M = 368$

Calc.% : $\text{S} = 8,69$

Tr. : 8,65

Spectre I.R. (dans KBr) : 3300 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1735 (COOMe), 1650 (Amide I), 1540 (Amide II).

Z-Met-Ala-OH : préparé comme Z-Met-Met-Ala-OH décrit dans le paragraphe I de la partie expérimentale, à partir de Z-Met-Ala-OMe.

$\text{Rd}^t = 80\%$ $F = 159-160^\circ\text{C}$

$[\alpha]_{546}^{21} = -8,6^\circ$ ($c=1$ diméthylformamide)

$R_f = 0,41$ (éther éthylique-acide acétique 20-1,8)

.../...

Analyse: $C_{16}H_{22}N_2O_5S$ M = 354

Calc.% : C = 54,24 H = 6,21 N = 7,91

Tr. : 54,22 6,30 8,02

Spectre I.R. (dans KBr): 3300 (ν_{N-H}), 1730-1720 (COOH dédoublée),
1648 (Amide I), 1550 (Amide II).

Z-Met-DL Ala-OH: préparé comme le précédent, à partir de
Z-Met- DL Ala-OMe.

Rdt = 80% F = 162-163°C

$[\alpha]_{546}^{21} = -6,2^\circ$ (c=1 diméthylformamide)

2 taches en C.C.M. (Rf = 0,41 (éther éthylique-acide
(acétique 20-1,8)
(Rf = 0,31

Analyse : $C_{16}H_{22}N_2O_5S$ M = 354

Calc.% : C = 54,24 H = 6,21 N = 7,91

Tr. : 54,20 6,35 7,97

Spectre I.R.(dans KBr): 3280 (ν_{N-H}), 1745-1715 (COOH dédoublée),
1640 (Amide I), 1550 (Amide II).

III- SYNTHÈSE DU POLYTRIPEPTIDE(Met-Met-Ala)_n ET DU POLYTETRA- PEPTIDE (Met-Met-Met-Ala)_n.

NPS-Met-Met-Ala-ONp: N.o.nitrophénylsulfényl-méthionyl-méthio-
nyl-alaninate de p.nitrophényle (méthode B).

Dans 100 ml de chloroforme on dissout à chaud 2,41 g (5 mM) de NPS-Met-OH, DCHA. Après avoir refroidi à 0°C on introduit sous agitation 1,03 g (5 mM) de dicyclohexylcarbodiimide et 1,9 g (5 mM) de HCl, H-Met-Ala-ONp, décrit dans la partie II. Après une heure de contact, on laisse le mélange revenir à température ambiante et on maintient sous agitation pendant plusieurs heures. On évapore ensuite le solvant sous pression réduite et on reprend le résidu par de la butanone anhydre à chaud. Le précipité constitué par la dicyclohexylurée et du chlorhydrate de dicyclohexylamine est filtré, et le produit recherché cristallise par addition au filtrat de quelques millilitres d'éther de pétrole. Il est recristallisé dans un mélange butanone-éther de pétrole.

.../...

Rd^t = 75 % F = 163-164°C (décomposition)

$[\alpha]_{546}^{22} = -39,1^{\circ}$ (c=0,6 diméthylformamide)

Analyse: C₂₅H₃₁N₅O₈S₃ M = 625

Calc.% : N = 11,20 S = 15,36

Tr. 11,26 15,39

Spectre I.R. (dans KBr) : 3315, 3265, 1758 (COONp), 1635, 735 (NPS)

Spectre U.V. : 380 mμ (dans ^{1e}dioxane)

HCl, H-Met-Met-Ala-ONp: Chlorhydrate de méthionyl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle.

On introduit 3,9 g (6,25 mM) du tripeptide précédent dans 15 ml d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique 3N. En chauffant légèrement, le milieu devient rapidement limpide. On ajoute alors de l'éther anhydre jusqu'à obtention d'un trouble. Le chlorhydrate cristallise rapidement. Il est isolé et purifié par recristallisation dans un mélange acétonitrile-acide acétique 100-5 (v/v) auquel on ajoute quelques millilitres d'éther anhydre.

Rd^t = 80 % F = 177°C (décomposition)

$[\alpha]_{546}^{25} = -44,0^{\circ}$ (c=0,8 acide acétique)

Analyse: C₁₉H₂₉N₄O₆S₂Cl M = 508,5

Calc.% : C=44,83 H=5,70 N=11,01 S=12,58 Cl=6,98

Tr. : 44,26 5,60 10,77 12,58 6,90

Spectre I.R. (dans KBr) : 3300, 3000, 1765 (COONp), 1650 (Amide I)
1345 (NO₂).

Poly(méthionyl-méthionyl-alanine):

On brasse 2,4 g (4,7 mM) du tripeptide C-activé précédemment obtenu avec 5 ml de chloroforme et on déclenche la polycondensation en ajoutant 0,66 ml de triéthylamine. Après quelques minutes, on observe la formation d'un gel translucide et on laisse la réaction se poursuivre pendant trois jours à température ambiante. Le polycondensat brut formé est dispersé dans quelques millilitres de chloroforme et on évapore ensuite à sec. Le résidu est lavé successivement à l'eau, l'alcool, l'éther pour

.../...

éliminer toutes traces de chlorhydrate de triéthylamine et de p.nitrophénol. Le produit rassemblé par centrifugation est finalement séché sous vide à 80°C. On obtient ainsi le copolypeptide brut dont les propriétés ont déjà été décrites en détail.

Rd^t ≠ 100%

F = supérieur à 350°C

Analyse: (C₁₃H₂₃O₃N₃S₂, 0,5 H₂O)_n.

Calc.% : C=45,75 H=7,03 N=12,31 S=18,73

Tr. 46,22 7,21 12,29 18,44

Préparation des composés modèles pour le contrôle chromatographique de la pureté optique du tripeptide C-activé,

NPS-Met-Met-D Ala-ONp: préparé comme NPS-Met-Met-Ala-ONp.

F = 165-166°C (décomposition)

$[\alpha]_{546}^{22} = + 36,2^{\circ}$ (c=0,6 diméthylformamide)

Analyse: C₂₅H₃₁N₅O₈S₃ M=625

Calc.% : N = 11,20 S = 15,36

Tr. : 11,05 15,38

Spectre I.R. (dans KBr) : 3280, 3070 (faible), 1770(COONp), 1645, 1345(NO₂), 735(NPS).

NPS-Met-Met-Ala-OMe: N.σ.nitrophénylsulfényl-méthionyl-méthionyl-alaninate de méthyle.

A une solution maintenue à 0°C, contenant environ 20 mM de HCl, H-Met-Ala-OMe (cf. Partie expérimentale I) dans 200 ml de chlorure de méthylène, on ajoute, sous agitation 5,6 g (20 mM) de NPS-Met-OH, DCHA et 4,12 g (20 mM) de dicyclohexylcarbodiimide. On laisse la réaction se poursuivre plusieurs heures, puis la dicyclohexylurée formée est filtrée et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux est repris par 100 ml d'acétate d'éthyle et cette solution est lavée successivement par du bicarbonate de sodium, de l'acide citrique (solutions aqueuses à 5%) et par de l'eau. On sèche sur sulfate de sodium et évapore le solvant. L'huile que l'on obtient cristallise par trituration à l'éther éthylique anhydre. Le produit est recristallisé plusieurs fois dans un mélange acétone-éther de pétrole.

Rd^t = 70 %

F = 143°C

$[\alpha]_{546}^{21} = - 62^{\circ}$

(c=1 dioxane)

.../...

Analyse: $C_{20}H_{30}N_4O_6S_3$ $M = 518$

Calc.% : N = 10,81 S = 18,53

Tr. 10,89 18,49

Spectre I.R.(dans KBr): 3280,3070,1745(COOMe),1652,1633,1342
(NO₂),735(NPS).

NPS-Met-Met-Ala-OH,DCHA: Sel de dicyclohexylammonium de la
N.o.nitrophénylsulfényl-méthionyl-méthionyl-
alanine.

On opère de la même façon que dans le cas de la synthèse de NPS-Met-Ala-OH,DCHA(cf.Partie Expérimentale II) en effectuant la réaction de saponification sur 2,1 g (4 mM) du produit précédent, à l'aide de 15 ml de méthanol, 80 ml d'acétone et 4,1 ml (4,1 mM) de soude 1N. Après addition de 0,8 ml de dicyclohexylamine à la solution dans l'acétate d'éthyle le sel précipite. Il est recristallisé plusieurs fois dans un mélange acétate d'éthyle-méthanol.

Rdt = 70 % F = 185°C (banc de Kofler)

$[\alpha]_{546}^{22} = - 47,9^{\circ}$ (c = 0,4 chloroforme)

Analyse: $C_{31}H_{51}N_5O_6S_3$ $M = 685$

Calc.% : C = 54,31 H = 7,44 N = 10,22

Tr. 54,03 7,55 10,49

Spectre I.R.(dans KBr): 3310,1655,1630,1335 (NO₂),735(NPS).

NPS-Met-Met-Ala-ONp: (à partir de NPS-Met-Met-Ala-OH,DCHA).

Ce tripeptide C-activé est préparé de la même façon que le dipeptide NPS-Met-Ala-ONp (décrit dans la Partie Expérimentale II) en libérant d'abord la fonction carboxylique de son sel de dicyclohexylammonium par l'acide sulfurique dilué. La réaction d'estérification par le p.nitrophénol qui suit,est menée dans le diméthylformamide, en présence de dicyclohexylcarbodiimide, à 0°C.

Après évaporation du solvant, l'huile résiduelle est triturée par l'éther anhydre et le produit qui précipite est recristallisé dans un mélange butanone-éther de pétrole.

Rdt = 65 % F = 144-145°C (décomposition)

$[\alpha]_{546}^{22} = - 12,3^{\circ}$ (c = 0,6 diméthylformamide)

.../...

Analyse: $C_{25}H_{31}N_5O_8S_3$ M=625

Calc.% : C = 48,00 N = 11,20 S = 15,36

Tr. : 48,06 11,21 15,52

Spectre I.R. (dans KBr): 3310(épaulement), 3265, 3070(faible),
1758 (COONp), 1635, 735(NPS).

Préparation d'un polytétrapeptide riche en méthionine.

NPS-Met-Met-Ala-ONp : N.o.nitrophénylsulfényl-méthionyl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle.

Dans 50 ml de chloroforme, on dissout à chaud 970 mg (2mM) de NPS-Met-OH, DCHA. Après avoir refroidi à 0°C, on introduit sous agitation 412 mg (2 mM) de dicyclohexylcarbodiimide et 1,02 g (2 mM) du tripeptide HCl, H-Met-Met-Ala-ONp décrit plus haut. Après une heure de contact, on laisse le mélange revenir à température ambiante et on maintient sous agitation pendant plusieurs heures. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu repris par de la butanone à chaud. La dicyclohexylurée et le chlorhydrate de dicyclohexylamine sont éliminés par filtration de la solution chaude et cette opération est répétée plusieurs fois. Le produit recherché précipite lorsque le filtrat est refroidi. Il est recristallisé plusieurs fois dans la butanone mais l'analyse élémentaire décèle malgré cela la présence d'urée résiduelle.

Rd^t = 75 % F = 175-177°C (décomposition)

$[\alpha]_{546}^{21} = -30,9^{\circ}$ (c=0,7 diméthylformamide)

Analyse: $C_{30}H_{40}N_6O_9S_4$ M = 756

Calc.% : C=47,62 N=11,11

Tr. : 50,52 11,22

Spectre I.R. (dans KBr): 3280, 3060(faible), 1770(COONp), 1640
(Amide I), 1545(NO₂), 735(NPS).

HCl, H-Met-Met-Met-Ala-ONp: Chlorhydrate de méthionyl-méthionyl-méthionyl-alaninate de p.nitrophényle.

On introduit 1,1 g(1,45 mM) du tétrapeptide précédent dans un mélange constitué par 4 ml d'acide acétique et 2 ml d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique 5N. Après quelques minutes, le milieu devient limpide et on ajoute alors quelques millilitres d'éther anhydre. Le chlorhydrate précipite rapidement. Il est recristallisé dans un mélange acétonitrile-acide acétique 50-30 (v/v).

.../...

$Rd^t = 85 \%$ $F = \text{décomposition vers } 210^\circ\text{C}$

$$[\alpha]_{546}^{25} = -37,8^\circ \quad (c = 0,8 \quad \text{Acide acétique})$$

Analyse: $C_{24}H_{38}N_5O_7S_3Cl$ $M = 639,5$

Calc.% : C=45,03 H=5,94 N=10,95 S=15,01

Te. 44,91 6,06 10,50 15,03

Spectre I.R.(dans KBr): 3280 (ν_{N-H}), 1765(COONp), 1645(Amide I),
1345(NO_2).

Poly(méthionyl-méthionyl-méthionyl-alanine).

On brasse 1,044 g (1,6 mM) du chlorhydrate de tétrapeptide C-activé précédemment décrit avec 2,5 ml de chloroforme et on déclenche la polycondensation en ajoutant 0,25 ml de triéthylamine; on laisse alors la réaction se poursuivre pendant 3 jours à température ambiante. Le polycondensat brut est dispersé dans quelques millilitres de chloroforme et on évapore ensuite à sec. Le résidu est lavé à l'eau, l'éthanol et l'éther éthylique et après centrifugation il est séché sous vide à 80°C . On obtient ainsi 735 mg ($Rd^t \neq 100\%$) d'un produit poudreux blanchâtre dont les propriétés ont déjà été décrites.

$F = \text{supérieur à } 350^\circ\text{C}.$

Analyse: $-(C_{18}H_{32}O_4N_4S_3)_n-$ $M=464$

Calc.% : C = 46,55 H= 6,90 N= 12,07

Tr. : 46,50 6,95 11,53

IV - SYNTHÈSE DE LA POLY METHIONYL-METHIONYL-GLYCINE.

Z-Met-Gly-OMe: N.Benzyloxycarbonyl-méthionyl-glycinate de méthyle.

Dans 200 ml de chlorure de méthylène à 0°C , on dissout 5,7g (20 mM) de Z-Met-OH; à cette solution, on ajoute successivement 1,8 g (20 mM) de H-Gly-OMe (obtenu en libérant le chlorhydrate HCl, H-Gly-OMe par addition de triéthylamine à une solution chloroformique) et 2,12 g (20 mM) de dicyclohexylcarbodiimide en agitant vigoureusement. Après une heure à 0°C , on laisse la réaction se poursuivre pendant une nuit à température ambiante. Après filtration de l'urée, le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu repris par de l'acétate d'éthyle.

Cette solution est lavée par du bicarbonate de sodium et de l'acide citrique (solutions aqueuses à 5%) et par de l'eau. Après séchage sur sulfate de sodium, le produit recherché est précipité par l'éther de pétrole. On le recristallise dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole.

$$R_d^t = 85 \% \quad F = 90-92^\circ\text{C}$$

20

$$[\alpha]_{546} = -26,5^\circ \quad (c = 1,7 \text{ méthanol})$$

Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ $M = 354$

Calc.% : $\text{N} = 7,91 \quad \text{S} = 9,04$

Tr. : $7,90 \quad 9,07$

Spectre I.R.(dans KBr): 3290 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3070(faible), 1738(COO Me), 1680, 1645(Amide I), 1540 (Amide II).

HCl, H-Met-Gly-OMe: Chlorhydrate de méthionyl-glycinate de méthyle.

On chauffe au reflux pendant 45 mn une solution contenant 7,1 g (20 mM) du dipeptide précédent dans 20 ml d'acide trifluoroacétique anhydre (distillé sur H_2SO_4). Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite et on reprend par quelques millilitres d'éthanol. Le chlorhydrate du dipeptide est alors précipité par addition d'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique. Il est purifié par dissolution dans l'éthanol et reprécipitation par l'éther anhydre. Il se présente sous la forme d'un produit huileux et est utilisé tel quel dans la réaction suivante.

Z-Met-Met-Gly-OMe: N.Benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-glycinate de méthyle.

A partir de 5,6 g (20 mM) de Z-Met-OH, 4,1 g (20 mM) de dicyclohexylcarbodiimide, 20 mM du chlorhydrate précédent et 2,8 ml de triéthylamine, on procède comme pour la préparation de Z-Met-Gly-OMe. Le produit final est recristallisé dans un mélange acétone-acétate d'éthyle.

$R_d^t = 70\%$ par rapport à Z-Met-Gly-OMe

$$F = 178^\circ\text{C} \quad [\alpha]_{546}^{20} = -29^\circ \quad (c=1 \text{ CHCl}_3)$$

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $M = 485$

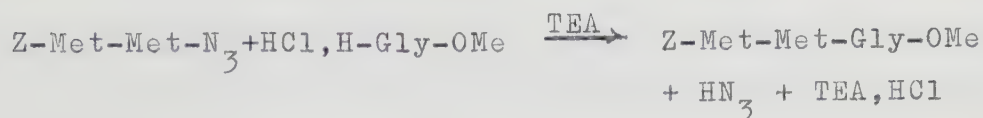
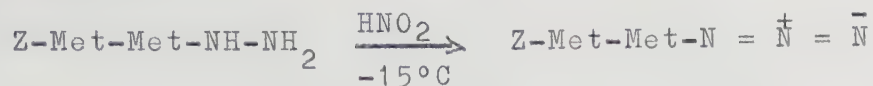
Calc.% : $\text{N} = 8,66 \quad \text{S} = 13,20$

Tr. : $8,72 \quad 13,15$

Spectre I.R.(dans KBr): 3280 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3060(faible), 1743(COOMe), 1685, 1638 (Amide I), 1538 (Amide II)

.../...

Le même tripeptide Z-Met-Met-Gly-OMe a été préparé par la méthode azide:



après plusieurs recristallisations dans un mélange acétone-acétate d'éthyle le produit final possède les mêmes caractéristiques physiques que le précédent.

Z-Met-Met-Gly-OH: N.Benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-glycine.

A une solution maintenue à 0°C et contenant 2,4 g (5 mM) de l'ester tripeptidique précédent dans un mélange dioxane-acétone (95-5), on ajoute 6 ml de soude 1N. Le mélange est maintenu pendant une nuit à froid. On ajoute ensuite 6 ml d'acide chlorhydrique 1N et on élimine les solvants sous vide. Le résidu solide est recristallisé plusieurs fois dans un mélange méthanol-eau puis dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole.

$$\text{Rd}^t = 88 \% \quad \text{F} = 169^\circ\text{C}$$

Analyse: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ $\text{M} = 471$

Calc.% : N = 8,92 S = 13,59

Tr. : 8,99 13,60

Spectre I.R. (dans KBr): 3290 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3070 (faible), 1740 (COOH), 1694, 1650 (Amide I), 1535 (Amide II).

Z-Met-Met-Gly-ONp: N.Benzyloxycarbonyl-méthionyl-méthionyl-glycinate de p.nitrophényle.

A une solution maintenue à 0°C de 4,70 g (10 mM) du tripeptide précédent dans 50 ml de diméthylformamide fraîchement distillé, on ajoute 1,52 g (11mM) de p.nitrophénol et 2,26 g (11mM) de dicyclohexylcarbodiimide et on agite pendant 24 heures. Après filtration de l'urée formée, on évapore le solvant sous vide. Le résidu solide est repris par le dioxane chaud, et l'urée qui précipite est de nouveau filtrée. Le produit cristallise par addition de quelques millilitres d'éther de pétrole. Il est très peu soluble dans les solvants courants comme l'acétone, le chloroforme et l'acétate d'éthyle d'où la présence d'un peu de dicyclohexylurée résiduelle dans le produit final.

$$\text{Rd}^t = 70 \% \quad \text{F} = 193^\circ\text{C}$$

$$[\alpha]_{546}^{22} = -22,5^\circ \quad (c=0,8 \text{ diméthylformamide})$$

.../...

Analyse: $C_{26}H_{32}O_8N_4S_2$ $M = 592$

Calc.% : C = 52,70 N = 9,46 S = 10,81

Tr. : 53,45 9,68 10,92

Spectre I.R.(dans KBr): 3280 (ν_{N-H}), 3070 (faible), 1766(COONp),
1687,1638(Amide I), 1555-1525(NO_2 , Amide II), 1350(NO_2).

HCl, H-Met-Met-Gly-ONp: Chlorhydrate de méthionyl -méthionyl-
glycinate de p.nitrophényle.

On chauffe au reflux pendant 45 mn, une solution contenant 3,3g (5,6 mM) du tripeptide précédent dans 6 ml d'acide trifluoroacétique fraîchement distillé sur H_2SO_4 (5 ml par litre d'acide trifluoroacétique). Le solvant est ensuite éliminé sous vide et le résidu huileux est repris par de l'isopropanol sec. Le tripeptide recherché est précipité à l'état de chlorhydrate par addition d'éther anhydre saturé de gaz chlorhydrique. Le produit est purifié plusieurs fois par des recristallisations dans un mélange isopropanol-éther anhydre. On obtient ainsi 2 g (Rdt:72%) d'un produit très hygroscopique, contenant un excès de chlore.

Analyse: $C_{18}H_{27}N_4O_6S_2Cl$ $M = 494,5$

Calc.% : Cl = 7,18

Tr. : 9,55

Spectre I.R.(dans KBr): 3200-3000 (très large), 1770 (COONp),
1680-1650 (large), 1550-1525 (Amide II, NO_2) 1345 (NO_2).

Poly(méthionyl-méthionyl-glycine):

A une solution contenant 2,5 g (5 mM) du chlorhydrate du tripeptide activé précédent dans 4 ml de chloroforme, on ajoute, en agitant, 0,90 ml (6,45 ml) de triéthylamine et abandonne le mélange pendant 3 jours à température ambiante. Après dilution par quelques millilitres de chloroforme, le solvant est évaporé sous pression réduite, et le résidu lavé successivement à l'alcool, l'eau, l'alcool et l'éther. Après séchage à 80°C, le polycondensat brut se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre qui fond au delà de 350°C.

$R_d^t = 70 \%$

Il est insoluble dans la plupart des solvants usuels et ne se dissout facilement que dans les acides forts.

$$[\alpha]_{546}^{23} = -57,8^\circ \quad (C=0,1 \text{ ADCA})$$

La caractérisation plus détaillée de ce polymère est reportée dans la partie IV.3.3. du texte.

B I B L I O G R A P H I E

-(arrêtée au 1/5/1971)

- (¹) R.A. BOISSONNAS et I. SCHUMANN -
Helv. Chim. Acta 35, 2229 (1952)
- (²) H. KITAOKA, S. SAKAKIBARA et H. TANI -
Bull. Soc. Chim. Japan 31, 802 (1958)
- (³) D.F. DE TAR, W. HONSBURG, U. HONSBURG, A. WIELAND, M. GOUGE,
H. BACH, A. TAHARA, W.S. BRINIGAR, F.F. ROGERS JR. -
J. Amer. Chem. Soc. 65, 2873 (1963)
- (⁴) a/ T. VAJDA - Chem. and Ind. 1, 785 (1963)
T. VAJDA - Acta Chim. Hung. 46, 221 (1965)
b/ A.T. MOORE et H.N. RYDON - Acta Chim. Hung. 44, 103 (1965)
c/ M.L. HUGGINS, K. OHTSUKA et S. MORIMOTO -
J. Polym. Sci. 23, 343 (1968)
d/ J. KOVACS, G.N. SCHMIT et U.R. GHATAK - Biopolymers 6, 817 (1968)
e/ J. KOVACS, R. GIANOTTI et A. KAPOOR -
J. Amer. Chem. Soc. 88, 2282 (1966)
- (⁵) M. FRIDKIN, A. FRENKEL et S. ARIELY - Biopolymers 8, 661 (1969)
- (⁶) a/ E. HEIDEMANN et H.W. NILL - Z. Naturforsch. 24b, 843 (1969)
b/ B.B. DOYLE, W. TRAUB, G.P. LORENZI, F.R. BROWN et E.R. BLOUT -
J. Mol. Biol. 51, 47 (1970)
c/ D.M. SEGAL - J. Mol. Biol. 43, 497 (1969)
- (⁷) W.J. BAILEY et R.C. CAPOZZA -
Amer. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. Polym. Prepr. 9, 1261 (1968)
- (⁸) a/ V.A. SHIBNEV, V.S. GRECHISHKO et K.T. POROSHIN -
Izv. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim. 1634 (1967)

.../...

- b/V.A.SHIBNEV,V.S.GRECHISHKO et K.T.POROSHIN-
Izv.Akad.Nauk SSSR Ser.Khim.2327 (1967)
- c/V.A.SHIBNEV,T.P.CHUVAEVA et K.T.POROSHIN -
Izv.Akad.Nauk SSSR Ser.Khim.954 (1967)
- d/V.A.SHIBNEV,K.T.POROSHIN et T.P.CHUVAEVA-
Izv.Akad.Nauk SSSR Ser.Khim 1144 (1968)
- e/V.A.SHIBNEV,T.P.CHUVAEVA,G.A.MARTYNOVA et K.T.POROSHIN-
Izv.Akad.Nauk SSSR Ser.Khim.637 (1969)
- (⁹) a/R.D.B.FRASER,B.S.HARRAP,T.P.Mac RAE,F.H.C.STEWART et
E.SUZUKI-
J.Mol.Biol.14,423 (1965)
- b/J.M.ANDERSON,W.B.RIPPON et A.G.WALTON -
Biochem.et Biophys.Res.Comm.39,802 (1970)
- c/D.F. DE TAR,M.GOUGE,W.HONSBURG et U.HONSBURG-
J.Amer.Chem.Soc.89,988 (1967)
- D.F. DE TAR,et T.VAJDA -
J.Amer.Chem.Soc.89,998 (1967)
- D.F. DE TAR,F.R.ROGERS et H.BACH-
J.Amer.Chem.Soc.89,3039 (1967)
- d/F.H.C. STEWART- Aust.J.Chem.19,1503 (1966)
Aust.J.Chem.19,2373 (1966)
- R.LEDGER et F.H.C.STEWART-
Aust.J.Chem.20,2509 (1967)
- e/G.SPACH et A.BRACK-
C.R.Acad.Sc.Paris (C) 265,19(1967)
- f/E.DELLACHERIE et J.NEEL-
C.R.Acad.Sc.Paris (C)266,527 (1968)
- E.DELLACHERIE et J.NEEL-
Bull.Soc.Chim.4,1218 (1969)
- G.BOUSSARD,E.DELLACHERIE et J.NEEL-
Bull.Soc.Chim.7,2544 (1970)
- (¹⁰) A.SCATTURIN,AM. TAMBURRO,R.ROCCHI et M.COLETTA-
Gazz.Chim.Ital.96,1383 (1966)
- A.SCATTURIN,A.M.TAMBURRO et R.ROCCHI-
Gazz.Chim.Ital.98,1247 (1968)

- (¹¹) B.J.JOHNSON-J.Chem.Soc.C.2638 (1967)
-id.- 3008 (1968)
-id.- 1412 (1969)
-id.- 2644 (1969)
- B.J.JOHNSON et E.G.TRASK-
J.Chem.Soc.C.2247 (1970)
- B.J.JOHNSON- J.Pharm.Sci.59,1849 (1970)
- (¹²) J.H.JONES - Chem.Comm.1436 (1969)
- (¹³) S.SAKAKIBARA,Y.KISHIDA,Y.KIKUKI,R.SAKAI et K.KAKUICHI-
Bull.Chem.Soc.Japan 41 ,1273 (1968)
- (¹⁴) R.B.MERRIFIELD-J.Amer.Chem.Soc.85,2149 (1964)
- (¹⁵) M.GOODMAN et C.GLASER-"Peptides.Chemistry and Biochemistry". Boris Weinstein ed.,Marcel Dekker inc.
N.Y.1970 , p.267.
- (¹⁶) H.DETERMAN - Proc.8th European Peptide Symp.,Noordwijk
(1966) p.73
- (¹⁷) H.MATSUO,Y.KAWAZOE,M.SATO,M.OHNISHI et T.TATSUNO-
Chem.Pharm.Bull.15,391 (1967)
- (¹⁸) J.KOVACS,G.L.MAYERS,R.H.JOHNSON et U.R.GHATAK-
Chem.Comm.1066 (1968)
- (¹⁹) J.KOVACS,G.L.MAYERS,R.H.JOHNSON,R.E.COVER et U.R.GHATAK-
J.Org.Chem.35,1810 (1970)
- (²⁰) S.M.BLOOM,G.D.FASMAN,C.DE LOZE et E.R.BLOUT-
J.Amer.Chem.Soc.84,458 (1962)
- (²¹) M.BERGMANN et L.ZERVAS-Ber.65,1192 (1932)
- (²²) O.GAWRON et F.DRAUS-J.Org.Chem.24,1392 (1959)
- (²³) a/K.MEDZIHARADSZKI et H.M.SCHWEIGER-
Acta Chim.Acad.Sci.Hung.44,15 (1965)
- b/H.YAJIMA,K.KAWASAMI,Y.KINOMURA,T.OSHIMA,S.KIMOTO et M.
OKAMOTO - Chem.Pharm.Bull.16,1342 (1968)
- (²⁴) F.WEYGAND et W.STEGLICH-Z.Naturforsch.14 b,272 (1959)
- (²⁵) J.M.MANNING et S.MOORE-J.Biol.Chem.243,5591(1968)
- J.M.MANNING-J.Amer.Chem.Soc.92,7449 (1970)
- (²⁶) D.F. DE TAR-Proc.8th European Peptide Symp.,Noordwijk
(1966) p.125

- (27) E.J.COHN et J.T.EDSALL-
"Proteins,Amino-acids and Peptides"
Reinhold,N.Y.1943, p.372
- (28) W.MOFFITT- J.Chem.Phys.25,467 (1956).
W.MOFFITT et J.T.YANG-Proc.Nat.Acad.Sci.42,596 (1956)
- (29) G.D.FASMAN- Methods in Enzymology-Colowick Kaplan vol.VI
(1963) p.928.
- (30) E.SHECHTER et E.R.BLOUT-Proc.Nat.Acad.Sci.51,794 (1964)
- (31) K.D.KOPPLE et E.BÄCHLI- J.Org.Chem.24,2053 (1959)
- (32) M.GOODMAN et K.C.STUEBEN-J.Amer.Chem.Soc.81,3980 (1959)
- (33) a/A.KAPOOR,E.J.DAVIS et M.J.GRAETZER-
J.Pharm.Sci.57,1514 (1968)
b/A.KAPOOR et W.GERENCSEY-
J.Pharm.Sci.58,976 (1969)
- (34) P.HUBERT,E.DELLACHERIE et J.NEEL-
I.U.P.A.C. Boston (1971)
- (35) L.ZERVAS,D.BOROVAS et E.GAZIS -
J.Amer.Chem.Soc.85,3660 (1963)
- (36) B.HALPERN,L.F.CHEW et B.WEINSTEIN-
J.Amer.Chem.Soc.89,5051 (1967)
- (37) G.BOUSSARD - Thèse de Spécialité-NANCY(1968)
- (38) a/Z.PRAVDA,K.PODUSKA et K.BLAHA-
Coll.Czechoslov.Chem.Comm.29,2626 (1964)
b/T.SOKOLOWSKA et J.F.BIERNAT-
J.Chromatogr.13,269 (1964)
- (39) H.SACHS et E.BRAND-J.Amer.Chem.Soc.76,1811 (1954)
- (40) G.E.PERLMAN et E.KATCHALSKI-
J.Amer.Chem.Soc.84,452 (1962)
- (41) A.BELHAJ-SOULAMI-Thèse de Spécialité.NANCY (1970)
- (42) T.MIYAZAWA,Y.MASUDA et K.FUKUSHIMA-
J.Polym.Sci.62,463 (1962)
- (43) F.COLONNA-CESARI,P.HORN,A.BELHAJ-SOULAMI,M.MARRAUD
et J.NEEL- J.Chim.Phys.66,2009 (1969)
- (44) G.SPACH,L.FREUND,M.DAUNE et H.BENOIT-
J.Mol.Biol.7,468 (1963)

.../...

- (45) J.T.YANG- "Poly α -amino-acids"
Ed. G.D.FASMAN-M.Dekker Inc.N.Y.(1967)p.266
- (46) D.BALASUBRAMANIAN- I.U.P.A.C.-Leyden (1970)
- (47) a/ G.D.FASMAN- "Poly amino-acids ,polypeptides and proteins"
M.A.STAHMANN ed.(1962)p.221.
- b/ I.M.KLOTZ,S.F.RUSSO,S.HANLON et M.A.STAKE-
J.Amer.Chem.Soc.86,4774 (1964)
- (48) P.J.URNES et P.DOTY-Advances in Protein Chemistry
16,475 (1961)
- (49) P.HUBERT - Thèse de spécialité- NANCY (1971)
- (50) W.T.ASTBURY- Nature 163,722 (1949)
- (51) F.H.C.CRICK et A.RICH - Nature 176,780 (1955)
- (52) A.BRACK et G.SPACH- C.R.Acad.Sc.C.271,916 (1970)
- (53) F.D.WILLIAMS,M.ESHAQUE et R.D.BROWN-
Biopolymers 10,753 (1971)
- A.BRACK - Thèse de Doctorat ès Sciences -STRASBOURG(1970)
- (54) H.ZAHN et L.REXROTH- Z.Anal.Chem.148 ,181 (1955)
-

A N N E X E I

Signification des symboles utilisés.

Lorsque l'écriture d'un acide aminé n'est précédé d'aucun symbole, il s'agit toujours de l'isomère L.

A	: résidu amino-acide général	-NH-CHR-CO-
-Met-	: résidu méthionyle	-R = -CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃
-Ala-	: résidu alanyle	-R = -CH ₃
-Gly-	: résidu glycyle	-R = -H

Act	: groupe activateur	
ADCA	: acide dichloracétique	
ATFA	: acide trifluoroacétique	
BOC	: tert.butylloxycarbonyle	(CH ₃) ₃ -C-O-CO-
DCCI	: dicyclohexylcarbodiimide	C ₆ H ₁₁ -N=C=N-C ₆ H ₁₁
DCHA	: dicyclohexylamine	C ₆ H ₁₁ -NH-C ₆ H ₁₁
DMF	: diméthylformamide	

HMPT : hexaméthylphosphorotriamide

Me : méthyle

$\overline{M}_n$: masse moléculaire moyenne en nombre.

$\overline{M}_w$: masse moléculaire moyenne en poids .

Np ou NP:	p.nitrophényle	-C ₆ H ₄ -NO ₂
-----------	----------------	---

Nps ou NPS:	o.nitrophénylsulfényle	NO ₂ -C ₆ H ₄ -S-
-------------	------------------------	--

P : groupe protecteur

Poly(L-L): polydipeptide H-(Met-Ala)_n-OH préparé à partir du dipeptide optiquement pur L-L.

Poly(L-L,D): polydipeptide H-(Met-Ala)_n-OH préparé à partir du mélange artificiel de dipeptides diastéréoisomères (L-L)+ (L-D) de proportion déterminée.

TEA	: triéthylamine	(C ₂ H ₅) ₃ -N
-----	-----------------	--

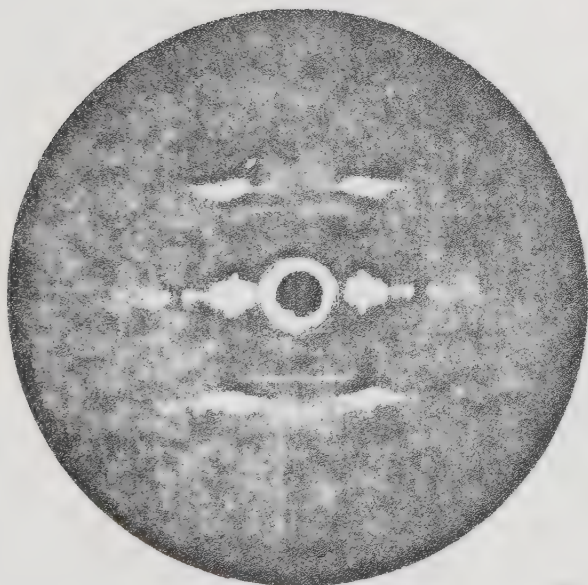
Z	: benzyloxycarbonyle	C ₆ H ₅ -CH ₂ -O-CO-
---	----------------------	---

-442
A N N E X E II

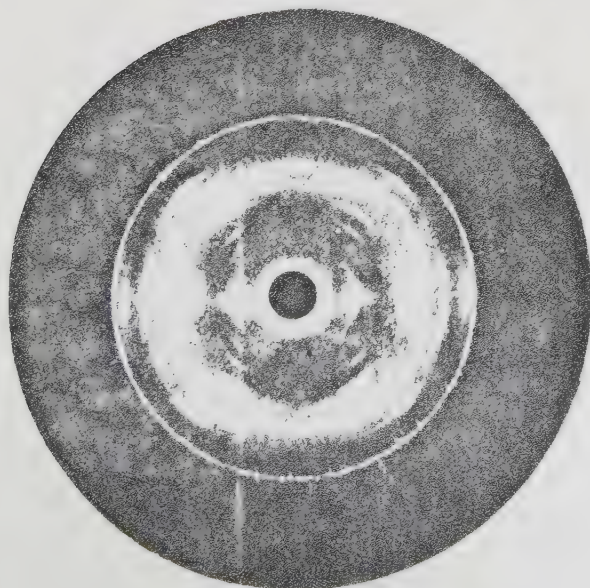
Clichés de diffraction des rayons X.



Poly(Méthionyl-Alanine)
soluble dans le chloroforme
échantillon non recuit.



Poly(Méthionyl-Alanine)
soluble dans le chloroforme
échantillon recuit à 150°C



Poly(Méthionyl-Méthionyl-
Alanine)

NANCY, le

Vu et Approuvé
et Permis d'Imprimer

Le Président de l'Université
de NANCY I.

J.R.HELLUY

Le Président
de l'U.E.R. - P.C.B.

F.STEPHAN

